

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I  
(Direktor: Prof. Dr. Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**Präklinische Untersuchungen zu der Rolle von Galectin-3 bei der  
Beteiligung des zentralen Nervensystems an der  
akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Nele Malaika Belau**

aus **Algermissen/Bledeln**

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Denis Schewe, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Claudia Baldus, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 28.02.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzende\*r der Prüfungskommission)

Σὰ βγείς στὸν πηγαμὸ γιὰ τὴν Ἰθάκη,  
νὰ εὔχεσαι νὰ ᾿ναι μακρὺς ὁ δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.

[ Κ. Π. ΚΑΒΑΦΗΣ ]

*Brichst du auf gen Ithaka,  
so wünsch dir eine lange Fahrt,  
voller Abenteuer und Erkenntnisse.*

[Konstantinos Petrou Kavafis]

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die akute lymphatische Leukämie im zentralen Nervensystem.....	2
1.2	Die Rolle von Galectin-3 bei Krebserkrankungen.....	5
1.3	Die Galectin-3/Mer Achse.....	8
1.4	Hypothesen dieser Arbeit .....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Zelllinien und Analyse von Zellen.....	11
2.1.2	Galectin-3 und Inhibitoren.....	13
2.1.3	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	14
2.1.4	Expressionsanalyse mittels qPCR.....	16
2.1.5	Geräte.....	17
2.1.6	Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.7	Software .....	18
<b>2.2</b>	<b>Methoden und Versuchstiere.....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Zellkultur .....	19
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität .....	19
2.2.3	Kokulturmodell.....	19
2.2.4	Herstellung von konditioniertem Medium.....	19
2.2.5	Magnetische Zellseparation .....	20
2.2.6	Durchflusszytometrie.....	20
2.2.7	Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Kernfärbung.....	20
2.2.8	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	21
2.2.9	Expressionsanalyse mittels qPCR.....	22
2.2.10	Mer-Knockdown durch shorthairpin Transfektion.....	23
2.2.11	Mausmodell .....	23
2.2.12	Xenotransplantation, Überwachung und Behandlung der NSG-Mäuse .....	24
2.2.13	Überlebenszeitanalyse .....	25
2.2.14	Analyse der Leukämielast im ZNS sowie in Knochenmark und Milz .....	25
2.2.15	Patientenkohorte .....	25
2.2.16	Statistische Auswertung.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
3.1	Galectin-3 verstärkt den Wachstumsarrest von 697-Zellen im U343-Kokulturmodell.....	27
3.2	Die Inhibition von Galectin-3 mit LJPC-1010 führt zu einer Reduktion der Viabilität von B-Vorläufer-ALL-Zellen .....	30
3.3	Die Galectin-3/Mer-Feedback-Achse .....	34
3.4	Oral verabreichtes LJPC-1010 führt im murinen Xenograftmodell zu einem verzögerten Ausbruch der Leukämie und zu verlängerten Überlebenszeiten bei unveränderter ZNS-Infiltration .....	36
3.5	In der untersuchten Kohorte t(1;19) <sup>+</sup> ALL-Patient*innen ist die Galectin-3 Expression in Knochenmarkproben als prognostischer Marker ungeeignet .....	39
3.6	Die Inhibition von Galectin-3 sowie die Herunterregulierung von Mer erhöhen die Galectin-1 Expression in 697-Zellen .....	41



---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Galectin-3 als Induktor eines Zellzyklusarrests von Leukämiezellen in der ZNS-Mikroumgebung .....	44
4.2	Galectin-3 als Apoptose-Inhibitor .....	46
4.1	Die Galectin-3/Mer-Achse.....	47
4.2	Galectin-3 als therapeutischer Angriffspunkt .....	48
4.3	Galectin-3 als prognostischer Parameter .....	51
4.4	Limitationen der Modelle .....	52
4.5	Ausblick.....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>68</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
Akt (PKB)	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-cell receptor; B-Zell-Rezeptor
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation; „Unterscheidungsgruppen“
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	cycle threshold; Zyklusschwellenwert
CRD	carbohydrate recognition domain; Kohlenhydraterkennungsdomäne
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3 (CXCR4 entsprechend)
DEPC	Diethyldicarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma; diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Enzymimmunoassay
FACS	fluorescence-activated cell sorting/scanning; Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum; Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter; Vorwärtsstreulicht
Gal-1	Galectin-1
Gal-3	Galectin-3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK-3β	Glykogensynthasekinase 3β
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IL-15	Interleukin-15
JAK	Januskinasen
kDa	Kilodalton

---

l	Liter
M	molar = mol/l
MACS	magnetic-activated cell sorting; magnetische Zellseparation
Mer	Mer-Tyrosinkinase
min	Minute(n)
min.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar = mmol/l
MRD	minimal residual disease; minimale Resterkrankung
MSC	mesenchymal stem cells; mesenchymale Stammzellen
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NAF	Natriumfluorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NSG	NOD scid gamma; NOD.Cg- <i>Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ</i>
p-Akt	phospho-Akt
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis; Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PSG-1	platelet selectin glycoprotein ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZNSL	primäres ZNS-Lymphom
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RIPA	radioimmunoprecipitation assay; Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure <sup>[SEP]</sup>
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RQ	relative Quantifikation
RQ-Wert	relativer Quantifikations-Wert
RT	Raumtemperatur
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SDS	sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
shRNA	short / small hairpin RNA
SPP1	secreted phosphoprotein 1, früher: Osteopontin (OPN)
SSC	side scatter; Seitwärtsstreulicht
STAT	signal transducers and activators of transcription
Syk	spleen tyrosine kinase
T-ALL	T-Zell-Leukämie
Tab.	Tabelle

---

TBS	Tris-buffered saline; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V	Volt
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
ZNS	Zentrales Nervensystem
β-GP	β-Glycerophosphat
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

# 1 Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne hämatologische Erkrankung und die häufigste Krebserkrankung in der Pädiatrie. Bei den in Deutschland jährlich etwa 600 neuerkrankten Kindern und Jugendlichen<sup>[1]</sup> kommt es zu einer Proliferation unreifer, nicht funktionstüchtiger Zellen der T- und B-Vorläufer-Zellreihe des blutbildenden Systems. Diese lymphatischen Blasten verdrängen die physiologische Hämatopoese im Knochenmark und verursachen so u.a. Knochenschmerzen, Anämien, Blutungen und schwere Infektionen. Unbehandelt verläuft die ALL tödlich.

Die Therapie verläuft nach Protokollen multizentrischer nationaler sowie zunehmend internationaler Studien. In Deutschland sind die meisten Kinder in die ALL-BFM Studie unter der Leitung von Prof. Dr. M. Schrappe eingebunden. Nachdem erkrankte Kinder in den frühen 60er Jahren innerhalb weniger Wochen verstarben<sup>[2]</sup>, überlebten zu Beginn der BFM-Vorgängerstudie in den 70er Jahren 66 % der Erkrankten die nächsten sechs Jahre<sup>[3]</sup>. Heute werden in Studien weltweit 5-Jahres-Überlebensraten von 85-90 % erreicht<sup>[4]</sup>.

Ein wesentlicher Bestandteil der Therapieoptimierung ist die Stratifizierung der Patient\*innen anhand ihres Rezidivrisikos. So soll jedem Kind eine zur Heilung ausreichend intensive Therapie mit möglichst geringer Therapietoxizität zukommen. In mehreren Blöcken erhalten Patient\*innen eine Polychemotherapie mit begleitender Behandlung der Nebenwirkungen. Für Hochrisikogruppen kommt je nach Studienprotokoll eine zusätzliche Stammzelltransplantation und/oder Schädelbestrahlung hinzu. Die Gesamtdauer der Therapie beträgt in der Regel zwei Jahre. Für die Therapieplanung relevante prognostische Faktoren sind dabei der Immunphänotyp der Leukämie, molekulare oder chromosomale Aberrationen und das Therapieansprechen<sup>[5]</sup>. Als derzeit aussagekräftigster Risikofaktor hat sich u.a. in den kooperativen AIEOP-BFM ALL Studien<sup>[6-8]</sup> das Vorhandensein einer minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) herausgestellt. Nachdem sich die mikroskopische Beurteilung des frühen Ansprechens auf Glukokortikoide als wichtiger Risikofaktor bereits etabliert hatte<sup>[9]</sup>, können nun auch mikroskopisch nicht detektierbare Mengen maligner Zellen mit einer Sensitivität von  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  in Knochenmark oder Blut erfasst werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Polymerase Kettenreaktion (PCR) kann so der Remissionsstatus sehr sensitiv quantifiziert und für die Planung der entsprechend intensiven weiteren Therapie genutzt werden<sup>[8]</sup>. Ungeachtet der Fortschritte ist die ALL-Behandlung jedoch noch immer mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden und führt nicht immer zur Heilung. Der häufigste Grund für ein Therapieversagen ist das Auftreten von Rezidiven<sup>[10]</sup>, zu denen es trotz intensiver Therapie bei 15-20 % der Erkrankten kommt<sup>[10, 11]</sup>. Da die Heilungschance bei Rezidiven nur noch bei ca. 50 % liegt, gehören diese zu den Haupttodesursachen von Krebserkrankungen im Kindesalter<sup>[10]</sup>.

## 1.1 Die akute lymphatische Leukämie im zentralen Nervensystem

Neben Patient\*innen mit besonders aggressiver Leukämie, deren Leukämielast sich nur schwer reduzieren ließ, erleiden auch Kinder mit gutem initialen Therapieansprechen Rezidive<sup>[6]</sup>. Eigentlich therapiesensitive Krebszellen können der zytostatischen Therapie entgehen und so ein Verbleiben von MRD verursachen. Ein möglicher Resistenzmechanismus ist der Übergang in einen reversiblen Wachstumsarrest, eine Quieszenz. Proliferieren Krebszellen zu einem späteren Zeitpunkt erneut, kann es zu Rezidiven innerhalb und außerhalb des Knochenmarks kommen<sup>[12-14]</sup>. Während extramedulläre Rezidive außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) mittlerweile selten sind, lässt sich bei jedem dritten Kind mit rezidivierter ALL eine ZNS-Beteiligung feststellen<sup>[15, 16]</sup>. Dies macht ZNS-Rezidive zu einer beachtlichen Ursache des Therapieversagens<sup>[17]</sup> und eine langfristige Remission abhängig von einer erfolgreichen Therapie der ALL in der ZNS-Nische<sup>[18]</sup>.

Deswegen erhält jedes an einer ALL erkrankte Kind eine ZNS-gerichtete prophylaktische Behandlung zur Verhinderung dortiger leukämischer Ansiedlung bzw. weiterer Ausbreitung<sup>[15]</sup>. Vor Einführung der ZNS-Prophylaxe zeigten über die Hälfte der erkrankten Kinder eine symptomatische Beteiligung des ZNS<sup>[19]</sup> und an verstorbenen ALL-Patient\*innen durchgeführte Autopsiestudien konnten in 60-70 % der Fälle einen ZNS-Befall nachweisen<sup>[20]</sup>. Die Einführung der ZNS-Prophylaxe führte zu einer deutlichen Reduktion der zentralnervösen Beteiligung der ALL, weshalb eine klinisch feststellbare ZNS-Beteiligung, manifestiert durch Kopfschmerzen oder Hirnnervenausfälle, heute selten ist<sup>[15]</sup>.

Die Diagnose eines ZNS-Befalls wird deswegen in erster Linie durch mikroskopische Beurteilung des zum Zeitpunkt der Erstdiagnose entnommenen Liquor cerebrospinalis gestellt. ZNS-Positivität ist dabei in der aktuellen ALL-BFM Studie definiert durch:

- Leukämische Blasten im Liquor-Zytospin  $\geq 6$  Leukozyten/ $\mu$ l Liquor
- Klinische und/oder radiologische Zeichen eines ZNS-Befalls: Nicht von einer extrazerebralen Manifestation verursachte Hirnnervenausfälle und/oder in der Magnetresonanztomographie oder in der Computertomographie sichtbare intrazerebrale Raumforderung oder meningeale Infiltration<sup>[21]</sup>

Der initiale ZNS-Status erwies sich als wichtiger Risikofaktor für Rezidive generell und für Rezidive im ZNS<sup>[22]</sup>. Daneben sind einige klinische Risikofaktoren für ZNS-Rezidive von Bedeutung: Das Vorliegen eines T-Zell ALL Immunphänotyps, eine Hyperleukozytose oder bestimmte genetische Aberrationen wie die Philadelphia-Translokation t(9;22), die Translokation t(4;11) oder die Translokation t(1;19)<sup>[15, 23]</sup>.

Kinder mit erhöhtem Risiko für ein ZNS-Rezidiv erhalten eine intensivere ZNS-gerichtete Therapie als Kinder ohne Risikokonstellation. Nachdem diese früher aus einer intensiven Strahlentherapie bestand, wurde die Bestrahlung mit wachsendem Wissen über Langzeitfolgen wie sekundäre Neoplasien, schwere chronische Erkrankungen oder kognitive Defizite<sup>[24]</sup> immer weiter reduziert und in den letzten

Jahren für die meisten Patient\*innen vollständig durch intrathekale Chemotherapie (Methotrexat (MTX), ggf. mit Cytarabin/Hydrocortison) und systemische Chemotherapie (Hochdosis-MTX, Dexamethason, Hochdosis-Cytarabin) ersetzt<sup>[5, 11, 25-27]</sup>. Derzeit wird in der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie, in der etwa 10 % der Patient\*innen eine Schädelbestrahlung erhielten<sup>[27]</sup>, eine weitere Reduktion der Einschlusskriterien für eine Bestrahlung und deren Dosis geprüft. In der Total Therapy Study XV des amerikanischen St. Jude Children's Research Hospital wurde bereits vollständig ohne Bestrahlung behandelt<sup>[25]</sup>. Doch auch die ZNS-gerichtete Chemotherapie ist mit akuter und langfristiger Neurotoxizität assoziiert. Auch Kinder, die im Rahmen der Total Therapy Study XV keine Bestrahlung erhielten, wiesen relevante Aufmerksamkeitsdefizite auf<sup>[28, 29]</sup>. Bei einer Untersuchung der Intelligenz von Kindern nach ALL-Therapie zeigte eine mit Hochdosis-MTX behandelte Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu der mit 24 Gy bestrahlten<sup>[30]</sup> und auch bei einer retrospektiven Untersuchung von ALL-Überlebenden im Median 26 Jahre nach Diagnosestellung wurden bei Patient\*innen, die nicht bestrahlt wurden, neurokognitive Beeinträchtigungen in allen betrachteten Bereichen nachgewiesen<sup>[31]</sup>. Neben den Langzeitfolgen kommt es bei bis zu 10-20 % der therapierten Kinder zu akuten Nebenwirkungen wie Leukenzephalopathien oder Meningitiden<sup>[32]</sup>. So ist es immens wichtig, durch eine präzise Diagnostik neben den Patient\*innen mit hohem Rezidivrisiko auch solche zu erkennen, die von einer Deeskalation der Therapie profitieren würden.

Mit aktuellen Diagnosestandards wird bei 3 % der Erstdiagnosen ein ZNS-Befall festgestellt<sup>[15, 22]</sup>. Trotz der erhöhten Rückfallwahrscheinlichkeit in dieser Gruppe, treten Rezidive vor allem bei Patient\*innen auf, bei denen kein initialer ZNS-Befall diagnostiziert wurde<sup>[22]</sup>. Dies bestätigt die klinischen<sup>[19]</sup>, pathologischen<sup>[20]</sup> und experimentellen<sup>[33]</sup> Hinweise darauf, dass ein ZNS-Befall nicht sensitiv genug diagnostiziert wird. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie<sup>[34]</sup> oder PCR<sup>[35, 36]</sup> kann die Beteiligung des ZNS deutlich sensitiver beurteilt werden. Eine Assoziation der durchflusszytometrisch ermittelten ZNS-Beteiligung und dem Rezidivrisiko zeigte sich bereits<sup>[34]</sup>. Größere prospektive Studien sollten aber die prognostische Relevanz des MRD-Monitorings im Liquor, welches die morphologische Liquoruntersuchung und das MRD-Monitoring in Knochenmark und Blut ergänzen könnte, weiter untersuchen<sup>[34, 37]</sup>.

Neben einer sensitiveren Erfassung des ZNS-Befalls ist es notwendig, neue Marker zu finden, die nicht nur den *status quo*, sondern auch einen zu erwartenden ZNS-Befall anzeigen. Dies hatten die folgenden zwei klinischen Untersuchungen zum Ziel. Zum einen konnten Cario *et al.*<sup>[38]</sup> durch Analyse des genetischen Profils leukämischer Blasten im Knochenmark eine Assoziation der Interleukin-15 (IL-15) - Expression mit einem erhöhten Risiko für ZNS-Rezidive aufzeigen. Zum anderen ermittelten van der Velden *et al.*<sup>[39]</sup> ein „ZNS-Protein-Profil“ leukämischer Zellen im ZNS. Bei Patient\*innen, die später ein Rezidiv erlitten, ließ sich durch Analyse dieser Proteine bereits zum Diagnosezeitpunkt eine „ZNS-gängige“ leukämische Subpopulation im Knochenmark identifizieren. Die prognostische Bedeutung dieser Analyse wird derzeit in einer prospektiven Studie geprüft. Während bekannte Risikofaktoren lediglich zur Planung der Intensität der Chemotherapie verwendet werden, könnten neue

Marker, wie bspw. die „ZNS-Proteine“ SPP1 und SCD, oder die Mer-Tyrosinkinase (Mer)<sup>[40]</sup> (1.3) neben ihrer diagnostischen und prognostischen Relevanz auch als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien dienen<sup>[39]</sup>.

Wichtig für die Konzeption neuer, weniger toxischer Therapiestrategien ist neben der Untersuchung von Patientenmaterial die präklinische Erforschung der Pathogenese der ZNS-Leukämie. Dabei ist der Weg leukämischer Zellen in das ZNS, welches unter physiologischen Bedingungen durch ein Barriersystem von der Peripherie abgegrenzt ist, noch unklar. Denkbare Eintrittswege sind:

- Blutgefäße der Hirnhäute (Migration durch das Gefäßendothel)
- direkt aus dem Knochenmark des Schädelknochens über Brückenvenen, die zu den Hirnhäuten führen
- der Liquor-produzierende Plexus choroideus
- das unlängst entdeckte<sup>[41]</sup> lymphatische System der Hirnhäute
- Mikroblutungen im ZNS oder iatrogen durch traumatische Lumbalpunktion<sup>[42]</sup>

Auch wie es zu Ansiedlung und Überleben der leukämischen Zellen im ZNS kommt, ist weitgehend unbekannt<sup>[33, 42, 43]</sup>. An unterschiedlichen präklinischen Modellen wurden und werden derzeit mögliche Pathomechanismen untersucht. So wurde bspw. das mit ZNS-Rezidiven assoziierte<sup>[38]</sup> Interleukin IL-15 weiter untersucht. Dabei ermittelten Frishman-Levy *et al.*<sup>[44]</sup> am *in vivo*-Modell eine Assoziation erhöhter IL-15 Expression von T-ALL- und humanen B-Vorläufer-ALL-Zellen mit der Aktivierung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Diese kontrollierten die leukämische Erkrankung in der Peripherie, konnten aber nicht in das ZNS gelangen und eine dortige leukämische Ansiedlung deswegen nicht verhindern. Bei Untersuchungen von Williams *et al.*<sup>[45]</sup> zeigten sich an B-Vorläufer-ALL-Zellen zwei Effekte: Zum einen steigerte IL-15 das leukämische Wachstum besonders unter Bedingungen, die dem Liquor ähnlich sind, zum anderen erhöhte IL-15 die Expression von PSGL-1 und CXCR3, welche mit dem „Homing“ in das ZNS assoziiert sind. So könnte die Assoziation von IL-15 mit ZNS-Rezidiven durch eine Beeinflussung der Immunantwort, des Wachstumsverhaltens leukämischer Zellen sowie der Transkription weiterer Moleküle erklärt werden. Neben dem Chemokinrezeptor CXCR3<sup>[45]</sup> wurden auch weitere Chemokinrezeptoren mit einem ZNS-Befall in Verbindung gebracht. Buonamici *et al.*<sup>[46]</sup> identifizierten die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und dessen Liganden CCL19 als entscheidend für die Migration von T-ALL-Zellen in das ZNS. Alsadeq *et al.*<sup>[43]</sup> wiesen nach, dass sowohl der Chemokinrezeptor CCR7 als auch der Chemokinrezeptor CXCR4 durch die Zeta-chain-associated protein kinase 70 (ZAP-70) reguliert werden. Im ALL-Xenograft-Modell zeigte sich ein Zusammenhang der Expression der ZAP-70 Tyrosinkinase mit der ZNS-Infiltration. Daneben ergab die Untersuchung von diagnostischen Knochenmarkproben bei der B-Vorläufer-ALL eine Assoziation der ZAP-70-Expressionslevel und bei der T-ALL eine Assoziation der CCR7-Expressionslevel mit einem ZNS-Befall<sup>[43]</sup>. Eine weitere relevante Tyrosinkinase, die Mer-Tyrosinkinase<sup>[40]</sup>, wird in Abschnitt 1.3 vorgestellt, weitere Ansätze zur Pathophysiologie der ZNS-ALL finden sich in dem aktuellen Review von Frishman-Levy und Izraeli<sup>[42]</sup>.

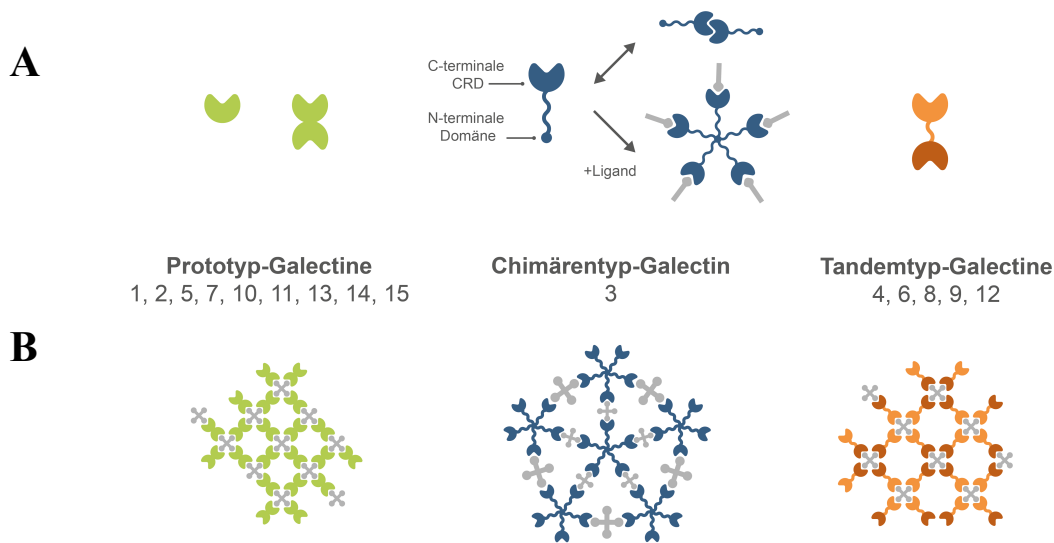


Den beschriebenen Forschungsergebnissen stehen Untersuchungen von Williams *et al.*<sup>[33]</sup> gegenüber. Diese wollten prüfen, ob nur einige leukämische Zellen in das ZNS gelangen können und das Rezidivrisiko somit von der Anwesenheit eines solchen Leukämiezell-Klons abhängig ist. Oder ob alle leukämischen Zellen sich im ZNS einfinden und eine subklinische ZNS-Beteiligung zum Diagnosezeitpunkt folglich bei allen Patient\*innen wahrscheinlich ist. In beiden Fällen wäre das Rezidivrisiko außerdem abhängig von der Adaption der Leukämiezellen an die fremde Mikroumgebung und ihrer Fähigkeit, einer Eliminierung durch antileukämische Therapie bzw. das eigenen Immunsystem zu entkommen. Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen an B-Vorläufer-ALL-Modellen der Arbeitsgruppe sprechen für letzteren Mechanismus. Hinweise auf eine selektive ZNS-Infiltration Chemokin-exprimierender leukämischer Zellen zeigten sich bislang nicht<sup>[33]</sup>. Ob ein postulierter Mechanismus der ZNS-ALL zu einer Infiltration leukämischer Zellen in das ZNS oder zu einem dortigen Überleben führt, ist allerdings oft nicht zu differenzieren. In jedem Fall sollte neben der Betrachtung leukämischer Zellen auch deren Interaktion mit der Mikroumgebung untersucht werden.

Trotz unterschiedlicher Untersuchungsansätze in den letzten zehn Jahren sind grundlegende Fragen zur ZNS-ALL noch offen<sup>[42]</sup>. Es bedarf einer besseren Differenzierung, welche Patient\*innen eine intensive ZNS-gerichtete Therapie benötigen und welchen eine Therapiede Eskalation zugutekommen könnte. Daneben ist die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiestrategien erforderlich.

## 1.2 Die Rolle von Galectin-3 bei Krebserkrankungen

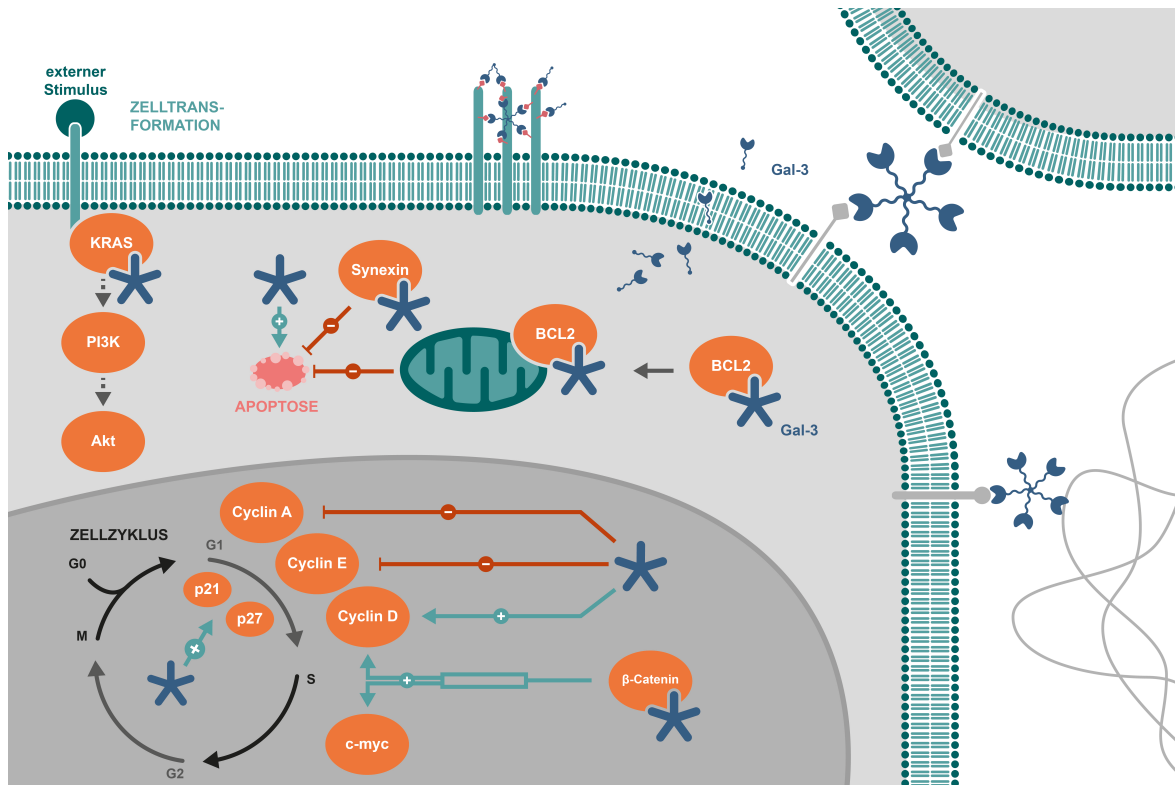
Galectin-3 (Gal-3) ist eines der am besten untersuchten Galectine, welche zu der Familie der Lectine gehören. Sie spielen eine wichtige Rolle im blutbildenden System, beeinflussen die Lymphopoese und sind im ZNS an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt<sup>[47]</sup>, unter pathologischen Bedingungen beeinflussen sie Entzündungen und Neoplasien<sup>[48]</sup>. Strukturell teilen alle Galectine eine konservierte Kohlenhydraterkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain, CRD) mit einer hohen Affinität zu  $\beta$ -Galactosiden<sup>[49]</sup>. Anhand der Anzahl der CRDs und der Struktur der Galectine werden sie in drei Gruppen untergliedert (Abb. 1): Prototyp-Galectine (u.a. Gal-1), Tandemtyp-Galectine und Chimären-typ-Galectine (nur Gal-3). Galectine mit nur einer CRD können Homodimere bzw. Oligomere bilden, wodurch sie, wie auch die Galectine mit zwei CRDs, Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Adhäsion und das Clustern von Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermitteln können. Neben ihrer extrazellulären Lokalisation befinden sich Galectine auch intrazellulär. Hier können sie durch kohlenhydratunabhängige Bindung an verschiedenste Partner unterschiedliche Signalwege sowie das Spleißen der RNA beeinflussen<sup>[50-52]</sup>.



**Abb. 1: Mitglieder der Galectin-Familie** | Anhand ihrer Struktur werden Galectine in drei Gruppe unterteilt. **(A)** Prototyp-Galectine enthalten eine Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) und existieren häufig als Homodimere. Galectin-3 (Gal-3), das einzige Chimärentyp-Galectin, besitzt eine CRD, die über eine prolin- und glycinreiche Domäne mit einem N-terminalen Schwanz verknüpft ist. Gal-3 Monomere können sich über ihren C-Terminus aneinanderlagern, bei Ligandenbindung kann Gal-3 N-terminal vermittelt Pentamere bilden. Tandemtyp-Galectine besitzen zwei CRDs mit leicht unterschiedlichen Bindungsspezifitäten, die über ein Linker-Peptid miteinander verbunden sind. **(B)** Bei der Bindung von Glykokonjugaten können Galectine Gitter bilden. Dadurch werden extrazellulär Zell-Zell-Interaktionen, die Stimulation und Verlängerung von Signaltransduktionen (durch das Clustern von Rezeptoren auf der Zelloberfläche) und Zell-Matrix-Adhäsionen vermittelt. Zusammengestellt nach Darstellungen der Galectin-Familie in den zitierten Publikationen<sup>[51, 53]</sup>.

Durch intra- und extrazelluläre Wirkungen sind Galectine an charakteristischen Eigenschaften von Krebszellen („Hallmarks of Cancer“<sup>[54]</sup>) beteiligt. Sie vermitteln Proliferationssignale, das Umgehen der Apoptose, Immunevasion, Angiogenese und Metastasierung<sup>[53]</sup>. Für Gal-3 sind alle genannten Wirkungsweisen beschrieben, einige sind schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Gal-3 wird durch das LGALS3-Gen kodiert und wurde initial als 32 kDa großes Oberflächenantigen Mac-2 auf Maus-Makrophagen identifiziert<sup>[55]</sup>. Anders als alle anderen bekannten Galectine besitzt Gal-3 neben der CRD auch eine N-terminale Domäne. Während die C-terminale CRD die Kohlendhydratbindung und eine Dimerisierung von Gal-3 vermittelt, führt die N-terminale Domäne bei Anwesenheit von Bindungspartnern zu einer Pentamerbildung (Abb. 1). Exprimiert ist Gal-3 in unterschiedlichen humanen Zellen, unter anderem in Immunzellen, wie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen, Langerhans-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, in Epithelzellen und in sensorischen Neuronen<sup>[56, 57]</sup>. Im ZNS ist Gal-3 in Gliazellen, darunter Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert<sup>[58]</sup>.



**Abb. 2: Intra- und extrazelluläre Wirkungen von Galectin-3** | Galectin-3 (Gal-3) kann intrazellulär zwischen Nucleus und Zytoplasma pendeln und durch unkonventionelle Sekretion in den Extrazellulärraum gelangen. Je nach Tumorentität und Lokalisation sind unterschiedliche Wirkungsweisen des Galectins beschrieben. Einige sind exemplarisch aufgeführt, wobei insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Moleküle erwähnt sind. Gal-3 kann durch Bindung an Glykoproteine der Extrazellulärmatrix eine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln, die Oberflächenexpression von Glykoproteinen (z.B. CD44) modulieren, Rezeptorkinasen (z.B. CD45 oder den T-Zell-Rezeptor) regulieren und Metastasierung und Immunevasion vermitteln. Außerdem kann Gal-3 Einfluss auf die Apoptoseregulation nehmen, wobei zytoplasmatisches Gal-3 die Apoptose z.B. durch Bindung an Bcl-2 inhibieren kann, während nucleäres Gal-3 durch Interaktion mit Nuclien proapoptotisch wirkt. Durch Hemmung von Cyclin E und A oder durch Steigerung der Synthese der Proteine p27 und p21 kann Gal-3 den Zellzyklus beeinflussen. Auf tumorfördernde Signaltransduktionen kann Gal-3 einwirken, indem es z.B. durch Bindung an aktiviertes KRAS Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg nimmt oder durch die Interaktion mit β-Catenin die Expression von Cyclin D und c-myc erhöht. Zusammengefasst in Anlehnung an Darstellungen intra- und extrazellulärer Wirkungen von Gal-3 in den zitierten Publikationen<sup>[50, 56, 57, 59]</sup>. In der Abbildung vorkommende Moleküle sind unterstrichen.

Eine veränderte Expression unterschiedlicher Galectine wurde bei vielen Krebserkrankungen nachgewiesen. In einer Metaanalyse von Thijssen *et al.*<sup>[53]</sup> wurden die Ergebnisse von über 200 Originalstudien zusammengetragen. Es zeigte sich, dass sich bei nahezu allen untersuchten Entitäten im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöhte Expressionslevel von Gal-1 fanden. Bei der Expression von Gal-3 entsteht dagegen ein heterogenes Bild. Für Tumore des Magen-Darm-Traktes, der Harnwege und der Schilddrüse wurde von einer erhöhten Expression im Zuge der malignen Transformation berichtet, bei Tumoren des Reproduktionstraktes von einer erniedrigten. Auch bei hämatologischen Erkrankungen wurden in unterschiedlichen Krebsentitäten sowohl erhöhte als auch verringerte Gal-3 Expressionslevel gezeigt. Erhöhte Werte wurden bei dem anaplastisch-großzelligen Lymphom<sup>[60]</sup> oder der chronischen myeloischen Leukämie (CML)<sup>[61]</sup> nachgewiesen, verringerte bei der

chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)<sup>[62]</sup>. Oft wurden erhöhte Expressionslevel auch lediglich in einzelnen Patientenuntergruppen festgestellt, wie bspw. beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) oder beim kutanen T-Zell-Lymphom. Prognostisch gibt es unabhängig von der Krebsentität vielerlei Belege, dass die Erhöhung von Gal-1 mit einem schlechten Gesamt- und ereignisfreien Überleben assoziiert ist. Der prognostische Stellenwert der Gal-3 Bestimmung ist dagegen weniger eindeutig<sup>[53]</sup>. Untersuchungen zum Glioblastom zeigten jedoch eine positive Korrelation zwischen Gal-3 Expressionslevel und Tumorgrad<sup>[63-65]</sup> bzw. eine Assoziation hoher Gal-3 Expression und einer schlechten Prognose<sup>[66]</sup>. Für die akute myeloische Leukämie (AML) konnten Cheng *et al.*<sup>[67]</sup> eine Assoziation von im Knochenmark gemessener Gal-3 Expression oberhalb des Medians mit schlechtem Gesamtüberleben zeigen und für die t(9;22)<sup>+</sup> B-Vorläufer-ALL wiesen Fei *et al.*<sup>[68]</sup> im Knochenmarkplasma von Patient\*innen im Vergleich zu Proben von Nichterkrankten erhöhte Gal-3 Level nach.

Als Bestandteil der Tumormikroumgebung kann sezerniertes Gal-3 im Knochenmark Überlebensmechanismen leukämischer Zellen vermitteln<sup>[69, 70]</sup>, zur Rolle von Gal-3 bei der ALL im ZNS ist neben den Ergebnissen von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> (1.3) aber bisher nichts bekannt. Für das primäre ZNS-Lymphom (PZNSL) wurde jedoch gezeigt, dass der B-Zell-Rezeptor (B-cell receptor, BCR) der PZNSL-Zellen Gal-3 erkennt. Da Gal-3 unter pathologischen Bedingungen wie bei Tumorerkrankung oder Inflammation im ZNS erhöht ist, könnte dies die isolierte Manifestation des PZNSL im ZNS erklären<sup>[71]</sup>, was generell auf Gal-3 als relevantes Protein bei malignen lymphatischen Erkrankungen im ZNS hinweisen könnte. Inwieweit durch Gal-3 vermittelte Überlebensmechanismen auch im Rahmen der t(1;19)<sup>+</sup> ALL im ZNS eine Rolle spielen, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.3 Die Galectin-3/Mer Achse

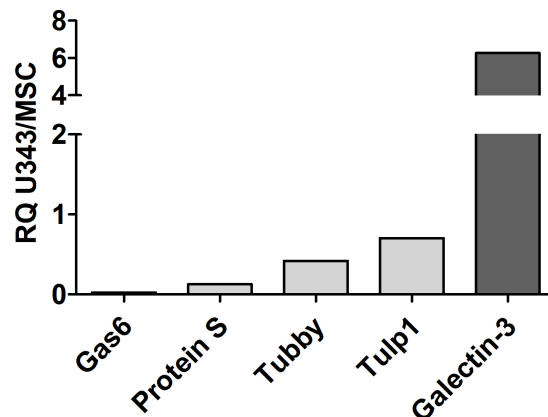
Die Tyrosinkinase Mer gehört neben Tyro-3 und Axl zu den TAM Rezeptoren. Sie ist in Tumorzellen unterschiedlicher Krebserkrankungen überexprimiert und kann Migration und Chemoresistenz maligner Zellen vermitteln<sup>[72]</sup>. Während Lymphozyten die Mer-Tyrosinkinase unter physiologischen Bedingungen nicht exprimieren, wird sie von einigen T- und B-Vorläufer-ALL-Zellen exprimiert. Das daraus hervorgehende therapeutische Potential wurde an Modellen der T- und B-Vorläufer-ALL bestätigt: Bei beiden Entitäten führte eine Inhibition der Tyrosinkinase *in vitro* zu einer Erhöhung der Apoptoserate und Chemosensitivität leukämischer Zellen und verlängerte *in vivo* die Überlebenszeiten xenotransplanteder Mäuse<sup>[73-75]</sup>. Auch in B-Vorläufer-ALL-Zellen mit der Translokation t(1;19)(q23;p13), wurde eine hohe Mer-Expression nachgewiesen<sup>[75]</sup>. Die Translokation t(1;19) führt zu dem Fusionsgen E2A-PBX1 (oder TCF3-PBX1) und findet sich bei 2-6 % der ALL-Patient\*innen im Kindes- und Jugendalter. Sie ist mit einer guten Prognose, jedoch auch mit einem hohen Risiko für

Rezidive im ZNS assoziiert<sup>[23, 76]</sup>. Das an der Translokation beteiligte Homöobox-Gen PBX1 reguliert die Hämatopoese und vermittelt die Quieszenz hämatopoetischer Stammzellen. In einer aktuellen Untersuchung zeigten Gaynes *et al.*<sup>[17]</sup>, dass PBX1 bei der B-Vorläufer-ALL eine ZNS-Nischen spezifische Infiltration und Chemoresistenz leukämischer Zellen vermittelt. Inwieweit PBX1 und das Fusionsprodukt E2A-PBX1 der t(1;19)<sup>+</sup> ALL gleiche Gene regulieren und somit gleiche Effekte vermitteln, ist noch nicht geklärt, wenngleich Überschneidungen wahrscheinlich sind<sup>[77]</sup>.

Die Rolle der Mer-Tyrosinkinase bei der t(1;19)<sup>+</sup> ALL im ZNS wurde von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> an präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen, sowie anhand klinischer Patientencharakteristika untersucht. Es zeigte sich, dass Mer-exprimierende ALL-Zelllinien im *in vitro*-Modell der ZNS-Nische in einen Arrest übergehen, wodurch sich ihre Sensitivität gegenüber MTX verringert. Im murinen ALL-Xenograft-Modell kam es bei der Transplantation leukämischer Zellen von t(1;19)<sup>+</sup> ALL-Patient\*innen mit hoher Mer-Expression zu einem stärkeren ZNS-Befall der Versuchstiere als bei der Transplantation von Zellen mit niedrigen Mer-Expressionsleveln. Eine genetische Herunterregulation von Mer sowie eine Behandlung mit dem niedermolekularen Mer-Inhibitor UNC-569<sup>[78]</sup> ging mit einem reduzierten ZNS-Befall der Versuchstiere einher. In einer Patientenkohorte mit t(1;19)<sup>+</sup> ALL zeigte sich eine Korrelation der Mer-Expressionslevel mit klinischen Parametern, die auf eine ZNS-Infiltration bei der Erstdiagnose hinweisen. Bei der Analyse der Genexpressionslevel der sechs bekannten Mer-Liganden (Gas6, Protein S, Tubbby, Tulp1 und Gal-3) in den ZNS-Zellen des *in vitro*-Modells zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollen 6-fach höhere Expression von Gal-3 (Abb. 3). Anschließend wurde auch in den Überständen von ZNS-ALL-Kokulturen eine hohe Gal-3 Konzentration festgestellt<sup>[40]</sup>.

Insgesamt konnte Mer bei der t(1;19)<sup>+</sup> ALL mit Quieszenz, Chemoresistenz und dem ZNS-Befall in Verbindung gebracht werden, wobei Gal-3 als vermittelnder Ligand in Frage kommt. Die Ergebnisse von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> liefern die Grundlage dieser Arbeit.

A



**Abb. 3: Zellen des ALL-ZNS-Modells zeigen eine hohe Expression des Mer-Liganden Gal-3** | Durch eine PCR-Analyse wurde die Expression bekannter Mer-Liganden in U343-Zellen, den ZNS-Zellen des genutzten *in vitro*-Modells, gemessen und mit der Expression in mesenchymalen Stammzellen (MSC) verglichen. RQ = Relativer Quantifikationswert. Abb. aus der Veröffentlichung von Krause *et al.*<sup>[40]</sup>, leicht adaptiert.

## 1.4 Hypothesen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob Mer-assoziierte Überlebensmechanismen bei der ALL im ZNS im Kindesalter<sup>[40]</sup> im Zusammenhang mit Gal-3 in der Mikroumgebung stehen.

Durch *in vitro*- und *in vivo*-Modellierungen sowie durch Messungen der Galectinexpression in Patientenproben mit anschließender Korrelation mit klinischen Patientendaten sollten folgende Hypothesen adressiert werden:

- 1) Die vermutete Gal-3/Mer Achse vermittelt einen ZNS-Befall bei der  $t(1;19)^+$  ALL im Kindesalter.
- 2) Gal-3 ist bei  $t(1;19)^+$  Leukämiezellen in der ZNS-Nische an der Arrestvermittlung beteiligt.
- 3) Die Inhibition von Gal-3 reduziert die Viabilität von Leukämiezellen.
- 4) Gal-3 kann bei der  $t(1;19)^+$  ALL als Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie genutzt werden.
- 5) Gal-3 Expressionslevel im Knochenmark zum Diagnosezeitpunkt einer  $t(1;19)^+$  ALL haben prognostische Aussagekraft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In Tab. 2 bis Tab. 13 sind die für diese Arbeit verwendeten Produkte unter Angabe der Hersteller (bei erster Nennung unter Angabe des Firmensitzes) genannt. Für selbst angesetzte Lösungen ist deren Zusammensetzung angegeben.

#### 2.1.1 Zelllinien und Analyse von Zellen

In Tab.1 werden die verwendeten Zelllinien und die für die Kultivierung und Versuche verwendeten Medien aufgeführt. (Die Herstellerangaben der Zellkulturmedien finden sich in Tab. 2.)

**Tab. 1: Zelllinien**

Name	Spezifität / Translokation	Bezugsquelle / Referenz	Zellkulturmedium
697 (EU-3)	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen / t(1;19)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (DSMZ)	RPMI1640 + 20 % Fetales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin/Streptomycin
CEM	T-ALL	DSMZ	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
HL-60	AML	Prof. Martin Stanulla, MHH, Hannover / <sup>[79, 80]</sup>	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
HSB-2	T-ALL	DSMZ	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
Jurkat	T-ALL	PD Dr. Renate Burger (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, UKSH Kiel) / <sup>[81]</sup>	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
MHH-Call3	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen / t(1;19)	Prof. Martin Stanulla, MHH, Hannover / <sup>[82]</sup>	RPMI1640 + 20 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
MSC	Immortalisierte mesenchymale Stammzellen	Prof. Dario Campana, Memphis, USA / <sup>[83]</sup>	RPMI1640 + 10 % FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 1 µM Hydrocortison

REH	Akute Leukämie, B-Zell- Vorläuferzellen / t(12;21)	DSMZ	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
RS4;11	Akute Leukämie, B-Zell- Vorläuferzellen / t(4;11)	DSMZ	$\alpha$ -MEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
SUP-B15	Akute Leukämie, B-Zell- Vorläuferzellen / t(9;22)	DSMZ	McCoys 5A + 20 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
U343-MG (U343)	Gemischtes As- trozytom/Oligo- dendrogliom	Prof. Rolf Mentlein, CAU, Kiel / <sup>[84]</sup>	DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 25 mM HEPES + 1,8 mM L-Glutamin
UOCB6	Akute Leukämie, B-Zell- Vorläuferzellen / t(12;21)	Dr. Marketa Kubricano- va-Zaliova, CLIP, Prag, Tschechien / <sup>[85]</sup>	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Tab. 2: Medien, Puffer, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur und die Durchflusszytometrie

Beschreibung	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA (1×)	Life Technologies, Carlsbad, USA
<u>Einfriermedium</u> 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen Life Technologies
<u>Erythrozytenlysepuffer</u> 0,82 % Ammoniumchlorid 0,1 % Kaliumbikarbonat 0,05 % EDTA-Lösung (0,5 M)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
FACS-Puffer	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Hydrocortison 10mM in Ethanol	Sigma-Aldrich Th. Geyer
L-Glutamin (200 mM, endotoxinarm)	Biochrom GmbH, Berlin
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom



Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom
<u>PFA-Fixierungspuffer</u> 2 % PFA in PBS	Science Services GmbH, München Biochrom
PI/RNAase-Lösung	BD
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium Dulbecco's MEM (DMEM) (mit stabilem Glutamin und 4,5 g/L-Glukose)	Biochrom
Zellkulturmedium McCoy's 5A Medium (mit L-Glutamin)	Life Technologies
Zellkulturmedium RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin)	Biochrom
Zellkulturmedium α-MEM	GE Healthcare, Chicago, USA

**Tab. 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie und die Zellseparation**

Konjugierter Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-human CD19 PE	2 µl/Test	eBioscience, San Diego, USA
Anti-human CD45 FITC	2 µl/Test	eBioscience
Anti-mouse CD45 APC	1,25 µl/Test	eBioscience
Maus IgG1 κ PE; Isotypenkontrolle	2 µl/Test	eBioscience
Maus IgG1 κ FITC; Isotypenkontrolle	2 µl/Test	eBioscience
Ratte IgG2b κ APC; Isotypenkontrolle	1,25 µl/Test	eBioscience
Anti-human CD45 MicroBeads	20 µl/10 <sup>7</sup> Zellen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

### 2.1.2 Galectin-3 und Inhibitoren

**Tab. 4: Galectin-3 und Inhibitoren**

Material	Verwendete Konzentration	Hersteller
Rekombinantes Galectin-3, human	100, 500, 1000 ng/ml; 3 × 2 µg/ml	PeptoTech, Rocky Hill, USA
LJPC-1010	20 oder 50 µg/ml	La Jolla Pharmaceutical Company, San Diego, USA
UNC-569	800 nM	Axon Medchem, Reston, USA

### 2.1.3 Proteinanalyse mittels Western Blot

**Tab. 5: Material für die Herstellung von Zelllysaten und zur Proteinbestimmung**

Beschreibung	Hersteller
<u>Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz</u> 1:5 mit H <sub>2</sub> O verdünnt	Bio-Rad Laboratories, München
<u>RIPA-Puffer</u> 1 % Triton® X-100 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) 140 mM NaCl auf pH 8,0 eingestellt	Sigma-Aldrich Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Sigma-Aldrich  Apotheke
<u>RIPA<sup>+</sup>-Puffer</u> 930 µl RIPA-Puffer + 1 Tablette Protease Inhibitor	s.o. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<u>RIPA<sup>++</sup>-Lysepuffer</u> 830 µl RIPA-Puffer 100 µl RIPA <sup>+</sup> -Puffer 10 µl Natriumfluorid (NAF) 50 µl β-Glycerophosphat (β-GP) 10 µl Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	s.o. s.o. Sigma Sigma AppliChem GmbH, Darmstadt

**Tab. 6: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

Beschreibung	Hersteller
<u>10× Laufpuffer</u> 30,3 g Tris 141,1 g Glycin 10 g SDS Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l aufgefüllt auf pH 8,6 eingestellt	Sigma-Aldrich Carl Roth Carl Roth
<u>4× Probenpuffer</u> 20 ml 10 %ige SDS-Lösung 10 ml 1 M Tris (pH 6,8) 10 ml Glycerol 2,5 ml 0,1 %ige Bromphenolblau-Lösung mit dH <sub>2</sub> O bis 50 ml aufgefüllt unmittelbar vor Nutzung: + 5 % Beta-Mercaptoethanol	Carl Roth Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich AppliChem GmbH, Darmstadt  Sigma-Aldrich
<u>Molekulargewichtstandard</u> Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA

<u>Sammelgel</u> (1 Gel) 1,8 ml dH <sub>2</sub> O 0,9 ml Sammelpuffer 0,4 ml Acrylamid 30 µl Ammoniumpersulfat (APS; N <sub>2</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) 3 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED; C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	s.u. Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich Carl Roth
<u>Sammelpuffer</u> 60,5 g Tris 4 g SDS auf pH 6,8 eingestellt Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l aufgefüllt	Sigma-Aldrich Carl Roth
<u>Separierungsgel</u> (8% Acrylamid) (1 Gel) 3,6 ml dH <sub>2</sub> O 2 ml Separierungspuffer 2,1 ml Acrylamid 5 µl APS 7,5 µl TEMED	s.u. Serva Sigma-Aldrich Carl Roth
<u>Separierungspuffer</u> 181,7 g Tris 4 g SDS (0,4 %) Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 950 ml aufgefüllt auf pH 8,8 eingestellt Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l aufgefüllt	Sigma-Aldrich Carl Roth

Tab. 7: Puffer und Lösungen für den Western Blot

Beschreibung	Hersteller
<u>10× Transferpuffer</u> 30,3 g Tris 141,1 g Glycin 10 g SDS Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 800 ml aufgefüllt auf pH 8,6 eingestellt Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l aufgefüllt	Sigma-Aldrich Carl Roth Carl Roth
<u>10× Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)</u> 500 ml Tris-Lösung (1 M, pH 7,4) 90 g NaCl Volumen mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml aufgefüllt	Sigma-Aldrich Apotheke
<u>BSA-Blockierlösung</u> 5 % Bovines Serumalbumin (BSA) in TBST	Sigma s.u.

Methanol	Th. Geyer
<u>TBST</u> 0,1 % Tween 20 in TBS	Merck KGaA, Darmstadt s.o.
<u>Western Blot Detektionslösung</u> ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare

**Tab. 8: Antikörper für den Western Blot**

Unter Angabe der Verdünnung in 1 % BSA in TBST (s.o.), alle primären Antikörper sind aus Kaninchen gewonnen.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	1:1000
Anti-Akt (pan)	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-Phospho-Akt	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-GAPDH	Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Cell Signaling Technology	1:2000

### 2.1.4 Expressionsanalyse mittels qPCR

**Tab. 9: Primer für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)**

Codiertes Protein	Primer	Hersteller
Galectin-1	Hs_LGALS3_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Qiagen, Venlo, Niederlande
Galectin-3	Hs_LGALS1_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Qiagen
GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Qiagen
Mer	Hs_MERTK_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Qiagen

**Tab. 10: Kits und weitere Lösungen für die Expressionsanalyse**

Name	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich
Ethanol (70 %)	Th. Geyer
QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Trizollösung TRIzol™ Reagent	Life Technologies

### 2.1.5 Geräte

**Tab. 11: Verwendete Geräte**

Produkt	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	BD
Entwickler Curix 60	Agfa HealthCare, Mortsels, Belgien
Kipp-/Rollenmischer Stuart SRT 9	Stuart
Kühlzentrifuge Allegra™ X-22 R	Beckman Coulter, Brea, USA
Laborabzug Typ 2-453 (für RNA-Arbeit)	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze
Lichtmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Research® plus	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
QuadroMACS™ Starting Kit	Miltenyi
Heraeus® HERASafe® Sicherheitswerkbank (für Mausearbeit)	Heraeus, Hanau
Scanlaf Mars Safety Class 2 (für Zellkultur)	Labogene, Lynge, Dänemark
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wipptisch Rocker 25	Labnet International, Edison, USA
Zellkultur Inkubator INCO 153	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf

### 2.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

**Tab. 12: Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller
DEPC-Wasser	Bioline GmbH
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturflasche (T25) für adhärenz Zellen	Sarstedt
Gewebekulturflasche (T25) für Suspensionszellen	Sarstedt
Insulinspritzen BD Micro-Fine U-100	BD

Kryoröhrchen (2 ml)	Th. Geyer
MACS Säulen LS	Miltenyi
Microvette K-EDTA (100 µl)	Sarstedt
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Platten MicroAmp® Fast (96-Well)	Applied Biosystems
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
PVDF Membranen (Hybond-P Blotting Membrane)	GE Healthcare
Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Röhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Spektrometerküvetten	Sarstedt
Whatman-Papier Mini Trans-Blot® Filter Paper	Bio-Rad
Zellkulturplatten (6-well, 24-well, 96-well) für adhären- te Zellen / für Suspensionszellen	Sarstedt
Zellkulturschale (6 cm, 10 cm) für adhären- te Zellen / für Suspensionszellen	Sarstedt
Zellsieb (70 µm falcon steril)	Th. Geyer

### 2.1.7 Software

**Tab. 13: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CC (Version 17)	Adobe Systems Incorporated, San José, USA
BD CSampler™ Software	BD Bioscience
EndNote X8	EndNote, Philadelphia, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc, La Jolla, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft
RQ-Manager	Applied Biosystems
SDS Software 2.3	Applied Biosystems

## 2.2 Methoden und Versuchstiere

Zentrifugationsschritte zum Waschen oder Pelletieren von Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) und 1300 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) durchgeführt.

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien 697, CEM, HL-60, HSB-2, Jurkat, MHH-Call3, REH, RS4;11, SUP-B15 und UOCB6 wurden nach den Empfehlungen der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) kultiviert (siehe auch 2.1.1, Tab. 1 und Tab. 2). Die Kulturbedingungen für die MSC Zelllinie wurden dem Protokoll von Mihara *et al.*<sup>[83]</sup> entnommen. Alle Zellen wurden im Zellkulturinkubator bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und min. alle 3-4 Tage unter sterilen Bedingungen passagiert. Alle für die Zellkultur verwendeten Medien/Reagenzien wurden vor der Benutzung im 37 °C Wasserbad vorgewärmt. Adhärent wachsende Zellen wurden durch Inkubation mit 1× Trypsin-EDTA gelöst.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Zur Quantifizierung von Zellen wurden 10 µl Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Aus dem Mittelwert der Teilquadrate, dem Verdünnungs- und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) ergab sich die Zellzahl. Tote Zellen wurden aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit selektiv angefärbt, sodass so auch die Zellviabilität bestimmt werden konnte.

### 2.2.3 Kokulturmodell

Zur *in vitro*-Modellierung der ZNS-Nische wurde wie bei Krause *et al.*<sup>[40]</sup> ein Kokulturmodell mit einer humanen Gliom-Zelllinie verwendet. U343-Zellen stammen ursprünglich von einem Patienten mit gemischtem Oligodendrogliom/Astrozytom<sup>[84]</sup>. Um die U343-Zellen gut mit Leukämiezellen kulturell zu können, wurden sie zunächst für 24 h in ihrem Medium (alle Medien siehe Tab. 1 und Tab. 2 im Abschnitt 2.1.1) inkubiert, bis eine Konfluenz von 70 % erreicht war. Anschließend wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und 697-Leukämiezellen in ihrem Medium und in einem Verhältnis U343:697 = 1:5 dazugegeben. Zur Modellierung der Knochenmarknische wurden Leukämiezellen in Kokulturen mit humanen immortalisierten mesenchymalen Stammzellen (MSC)<sup>[83]</sup> kultiviert. Die Kokulturen wurden gleichermaßen, jedoch in einem Verhältnis MSC:697 = 1:10 angelegt.

### 2.2.4 Herstellung von konditioniertem Medium

Um die Effekte von sezernierten Stoffen der *in vitro* modellierten ZNS-Nische auf B-Vorläufer-ALL-Zellen zu untersuchen, wurden 697-Zellen in U343-konditioniertem Medium kultiviert. Für die Herstellung des konditionierten Mediums wurden U343-Zellen in 697-Medium inkubiert. Nach 72 h wur-

de das Medium abgenommen, durch Zentrifugation von Zellresten getrennt und anschließend für die Kultivierung von 697-Zellen verwendet. Als Kontrolle diente unkonditioniertes 697-Medium.

### 2.2.5 Magnetische Zellseparation

Für die Isolierung von 697-Zellen aus einer Zellsuspension wurde das QuadroMACS™ Starting Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Dieses beruht auf Magnetischer Zellseparation (magnetic-activated cell sorting, MACS). Dafür wurden Zellen mit Magnetpartikel-gekoppelten Antikörpern (MicroBeads) inkubiert, die spezifisch an das Leukozyten-Oberflächenmolekül CD45 binden. Die Zellsuspension wurde auf eine von einem starken Magnetfeld umgebene Säule gegeben, wodurch markierte Zellen zurück gehalten wurden. Nach Entfernung des Magnetfeldes konnten diese herausgespült werden. Die Reinheit der Zellpopulation wurde anschließend durchflusszytometrisch durch Anfärbung des B-Zell-spezifischen CD19 kontrolliert.

### 2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting/scanning, FACS) basiert auf der Erfassung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel. Das Anfärben zellspezifischer Oberflächenmoleküle erlaubt die Identifizierung spezifischer Zellen aus einer heterogenen Population. So wurden leukämische Zellen mittels Färbung der B-Zellspezifischen Oberflächenmoleküle CD45 und CD19 identifiziert.

Für die Analyse wurden je Probe  $1.0-1.5 \times 10^5$  Zellen verwendet. Diese wurden mit FACS-Puffer gewaschen, in 20 µl Antikörper-FACS-Puffer Lösung resuspendiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer zur Entfernung überschüssiger Antikörper und folgender Fixierung in 2 % PFA-PBS wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die Spezifität des positiven Signals wurde mit entsprechenden Isotypkontrollen überprüft.

### 2.2.7 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Kernfärbung

Zur Messung des DNA-Gehaltes von Zellen wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Dieser interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung. Die zum DNA-Gehalt proportionale Fluoreszenzintensität kann zur Analyse des Zellzyklusstatus genutzt werden. Dafür wurden Zellen nach einem Waschschrift mit eisgekühltem PBS (2000 rpm, 5 min) über Nacht in 75 %igem Ethanol (1,5 ml je Probe) bei -20 °C inkubiert, um die Zellen zu fixieren und die Membranen durchlässig zu machen. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (1800 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 150 µl PI/RNAase-Lösung resuspendiert und 30 min im Dunkeln inkubiert. Die RNase dient zum Abbau der RNA um Interpretationsfehler durch deren Detektion zu vermeiden. Im Anschluss wurden 150 µl FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.



## **2.2.8 Proteinanalyse mittels Western Blot**

### **2.2.8.1 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden Zellen pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 5 µl RIPA-Lysepuffer pro 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine min. 30-minütige Inkubation bei -80 °C. Dann wurde das Zelllysate auf Eis aufgetaut und der Zelldebris pelletiert (13200 rpm, 15 min, 4 °C). Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert bzw. die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.2.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mittels Bradford-Assay nach Angaben des Herstellers Bio-Rad Laboratories: Es wurde je 1 ml Bradford-Reagenz mit 1 oder 2 µl Proteinlösung vermischt und die Extinktion bei 595 nm gegen Leerwert gemessen. Mit Hilfe einer definierten Verdünnungsreihe aus BSA-Lösung wurde eine Eichkurve erstellt, aus der die Messwerte der Proben ermittelt wurden.

### **2.2.8.3 SDS-PAGE**

Mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten Proteine anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Es wurden gleiche Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben mit 4× Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden 15 µl Proben-Lysat (max. 30 µg Protein) sowie 6 µl des Molekulargewichtsstandards auf 8-10 %ige Polyacrylamid-Gele geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 1× Laufpuffer zunächst für 20 min bei 80-100 V und anschließend für 70-90 min bei 120 V.

### **2.2.8.4 Western Blot**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot-Verfahren auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Dafür wurden die Membranen mit Methanol aktiviert und anschließend mit dem Gel zwischen je zwei Whatman®-Papiere und einen Schwamm in eine Blotkassette eingespannt. Der Transfer erfolgte für 1-2 h bei 70-100 V in Transferpuffer unter ständiger Kühlung. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an der Membran zu verhindern, wurden die Membranen anschließend für 1 h in 5 % BSA in TBST inkubiert. Über Nacht wurden sie dann bei 4 °C mit dem primären Antikörper auf einem Kipp-/Schwenktisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBST gewaschen und 1 h mit dem sekundären Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren TBST-Waschschritten wurde für 1 min Chemilumineszenz-Detektionslösung auf die Membranen gegeben. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Röntgenfilms für 10 sec bis 30 min in der Dunkelkammer.

### **2.2.9 Expressionsanalyse mittels qPCR**

Für die Analyse der Transkription einzelner Gensequenzen wurde aus den je nach Versuchsaufbau behandelten Zellen RNA isoliert. Diese wurde in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend mit Hilfe der Echtzeit-PCR (qPCR) quantifiziert.

#### **2.2.9.1 RNA-Präparation und Messung**

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels Single-Step-Methode. Dafür wurden ca.  $4 \times 10^6$  Zellen pelletiert und in 1 ml Trizollösung resuspendiert. So wurden die Zellen lysiert, RNasen und andere Enzyme inaktiviert und die RNA gelöst. Die Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und zur Weiterverarbeitung auf Eis aufgetaut. Um die gelöste RNA von anderen Zellbestandteilen zu trennen, wurde 0,1 ml Chloroform zu jedem Reaktionsansatz dazugegeben und 2-3 min lang kräftig durchmischt. Durch anschließende 15-minütiger Zentrifugation bei 1200 g erfolgte die Phasentrennung: In der oberen flüssigen Phase befindet sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der unteren organischen Phase die Proteine. Die obere Phase wurde abgenommen und gleiches Volumen 70 %iges Ethanol dazu gegeben. Ab diesem Schritt wurde zur Aufreinigung der RNA das RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach dem entsprechenden Protokoll verwendet. Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurde mittels NanoDrop®-Spektrophotometer gemessen.

#### **2.2.9.2 cDNA-Synthese**

Aufgrund der hohen Instabilität von RNA wurde diese nach Isolierung in cDNA umgeschrieben. Für die Umschreibung, die reverse Transkription, wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Es wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt.

#### **2.2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR**

Mit Hilfe einer PCR können Zielsequenzen durch spezifische Primer enzymatisch vervielfältigt werden. Dies erfolgt in mehreren Zyklen, die aus je drei Schritten bestehen: Der Denaturierung der Doppelstrang-DNA, dem Primerannealing und der Elongation, der Amplifikation der Gensequenz zwischen dem Primerpaar. Die neu entstandenen DNA-Doppelstränge werden erneut denaturiert und elongiert, wodurch eine im Idealfall exponentiell wachsende DNA-Menge der Zielsequenz entsteht. Zur Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäure wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I in den PCR Ansatz hinzugegeben. Dieser interkaliert in die DNA-Doppelhelix, sodass die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus direkt proportional zu der Zunahme des PCR-Produktes ist. Die Farbsignale können in Echtzeit während der exponentiellen Phase der PCR gemessen werden. Der Beginn dieser Phase wird durch den Ct (cycle threshold)-Wert angezeigt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von  $2\text{ }\mu\text{M}$  eingesetzt; alle cDNA Proben wurden in Duplikaten mit einer Endkonzentration von 2 ng eingesetzt ( $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Die Reaktion erfolgte in 96-well Platten und pro 96-well wurde folgender PCR Ansatz pipettiert:

**Tab. 14: PCR Ansatz**

2x ABI Power SYBR® Green Master Mix	10 µl
Primer Assay	2 µl
cDNA Template	2 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	6 µl
<b>Endvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Die Proben wurden mit dem in Tab. 15 aufgeführten Programm gemessen. Zusätzlich zu Probenduplikaten wurde als Negativkontrolle ein Duplikat mit 2 µl dH<sub>2</sub>O analysiert.

**Tab. 15: PCR Programm**

Zeit	Temperatur	Zyklen
10 min	95 °C	1
15 sec	95 °C	45
45 sec	60 °C	

Nach Ablauf der PCR Zyklen erfolgte die Auswertung nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Als interne Kontrolle wurde das Referenzgen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, da dessen Expression konstitutiv und durch den experimentellen Ansatz nicht veränderlich ist. So konnten Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA ausgeglichen werden. Als Kalibrator wurden, wenn nicht anders angegeben, unbehandelte Zellen verwendet. Der relative Quantifikationswert (RQ-Wert) wurde wie folgt berechnet:

$$(1) \Delta C_t = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}$$

$$(2) \Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t\text{Kalibrator}}$$

$$(3) RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

### 2.2.10 Mer-Knockdown durch shorthairpin Transfektion

Zellen mit shRNA-vermitteltem Knockdown von Mer (697shMer) und mit Kontrollvektor transfizierte Zellen (697shGFP) wurden von Dr. Ameera Alsadeq (bei Durchführung: Max-Eder-Nachwuchsgruppe, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH Kiel; inzwischen: Institut für Immunologie, Universität Ulm) hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Knockdown wurde durchgeführt wie beschrieben<sup>[40]</sup>. Zur Kontrolle des Knockdown wurde die Mer-Genexpression vor Nutzung der Zellen mittels qPCR überprüft.

### 2.2.11 Mausmodell

Leukämiezellen einer t(1;19)<sup>+</sup> ALL wurden in immundefizienten Mäusen zum Engraftment gebracht. Dabei wurden NOD scid gamma (NSG) Mäuse (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) verwendet, welche wie scid-Mäuse eine gestörte Ausdifferenzierung von B- und T-Lymphozyten<sup>[86]</sup> und wie NOD-scid-

Mäuse eine gestörte Funktion von Komplementsystem, dendritischen Zellen und Makrophagen<sup>[87]</sup> aufweisen. Weiterhin tragen NSG-Mäuse ein mutiertes Gen der Interleukin-2-Rezeptor  $\gamma$ -Kette<sup>[88]</sup>, welche wichtiger Bestandteil der Rezeptoren unterschiedlicher Interleukine ist<sup>[89]</sup>. Somit bewirkt die Mutation eine starke Beeinträchtigung der B- und T-Lymphozytenfunktion und verhindert die Ausdifferenzierung von NK-Zellen<sup>[90]</sup>.

Die für diese Arbeit genutzten Tiere wurden von Charles River Laboratories bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel unter spezifizierten pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Für Versuche wurden weibliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes und im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrags („V243-32706/2015(71-5/15) mit entsprechenden Verlängerungen des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein“) durchgeführt.

### **2.2.12 Xenotransplantation, Überwachung und Behandlung der NSG-Mäuse**

Für die Transplantation verwendete Primärzellen stammten aus kryokonservierten Knochenmarkproben von pädiatrischen ALL-Patient\*innen zum Erstdiagnosezeitpunkt. Es wurden ausschließlich Proben verwendet, welche min. 90 % Blasten enthielten. Die intrafemorale Injektion von  $1 \times 10^6$  Leukämiezellen/30  $\mu$ l PBS erfolgte unter Isofluran-Narkose und analgetischer Therapie mit Buprenorphin/Temgesic® (1.5  $\mu$ g á 30  $\mu$ l je Maus subkutan). Bei der anschließenden täglichen visuellen Inspektion wurde besonders auf klinische Symptome einer akuten Leukämie wie Aktivitätsverlust, Gewichtsverlust, Organomegalie und schwache Parese der hinteren Extremität geachtet. Zur Beurteilung des Engraftments wurde ca. alle 4 Wochen die Last humaner Leukämiezellen im peripheren Blut überprüft. Dafür wurde die Vena facialis punktiert. Der in eine EDTA-Microvette aufgefangene Blutstropfen wurde zweimal in 1-4 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für je 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und für die Durchflusszytometrie wie in 2.2.6 beschrieben gefärbt. Es wurden Antikörper für murines CD45, humanes CD45 und humanes CD19 verwendet. Die prozentuale Blastenlast im peripheren Blut ergab sich durch die Detektion von für die humanen Lymphoblastenmarker doppelt positiven lebenden Zellen. Bei einer Blastenlast von > 75 % oder Erreichen der oben genannten Abbruchkriterien wurde das jeweilige Versuchstier tierschutzgerecht euthanasiert. Aus der Milz wurden Leukämiezellen gewonnen, welche wiederum kryokonserviert wurden. Diese Zellen der ersten Transplantation wurden für die Tierversuche dieser Arbeit verwendet. Die Injektion erfolgte analog der der Primärzellen. Alle Injektionen wurden von PD Dr. Denis Schewe (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH Kiel) durchgeführt.

Behandelt wurden die transplantierten Mäuse wöchentlich fünfmal mit dem Gal-3 Inhibitor LJPC-1010 (0,2 mg á 50  $\mu$ l je Maus). Die Applikation erfolgte mittels Magen-Schlundsonde direkt in den Magen der Tiere. Die Kontrollgruppe wurde nicht behandelt.

### 2.2.13 Überlebenszeitanalyse

Zur Beurteilung der Auswirkung von LJPC-1010 wurden die Überlebenszeiten der beiden Versuchstiergruppen miteinander verglichen. Als Endpunkt wurde der Tod definiert, der aus Tierschutzgründen bei beschriebenen Leukämiezeichen (2.2.12) herbeigeführt wurde.

### 2.2.14 Analyse der Leukämielast im ZNS sowie in Knochenmark und Milz

Die Versuchstiere wurden mit CO<sub>2</sub> tierschutzgerecht euthanasiert. Zur Beurteilung der ZNS-Infiltration wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte erstellt. Dafür wurden die Köpfe der Versuchstiere abgetrennt, in Formalin fixiert, dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet. Die histologische Beurteilung der Schnitte erfolgte verblindet durch Dr. med. Christian Vokuhl (Abteilung für Kinderpathologie des Instituts für Pathologie, UKSH Kiel). Folgende bereits etablierte semiquantitative Einteilung wurde verwendet<sup>[40, 43]</sup>:

- negativ (-) = keine Leukämiezellen sichtbar
- intermediär (+) = Leukämiezellen an der Dura mater sichtbar, keine subdurale Infiltration
- hoch (++) = Infiltration der Dura mater und subdurale Infiltration

Zur Beurteilung weiterer leukämischer Organinfiltration wurden auch Milz und Knochenmark untersucht. Dafür wurde die Milz in eine mit PBS gefüllte Zellkulturschale überführt und vermessen. Anschließend wurde sie mit einem Spritzenkolben durch ein 70 µm Zellsieb gerieben und wieder in PBS aufgenommen. Weiterhin wurden Femur und Tibia beider Hinterbeine entnommen. Die Knochenenden wurden gelenknah abgetrennt und Knochenmarkszellen mit einer Insulinspritze mit PBS aus den Knochen ausgespült. Die Zellen aus Knochenmark / Milz wurden im Anschluss pelletiert und in entsprechend 2 ml / 20 ml Erythrozytenlysepuffer für 7 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie pelletiert und in PBS aufgenommen. Es wurden Zellzahl und -viabilität wie in 2.2.2 beschrieben ermittelt.

### 2.2.15 Patientenkohorte

Die in dieser Arbeit analysierte cDNA wurde bereits für Vorarbeiten hergestellt<sup>[40]</sup> und stammt von 61 Kindern und Jugendlichen, bei denen eine t(1;19)<sup>+</sup> ALL festgestellt wurde. Die Probenentnahme erfolgte nach aufgeklärter Zustimmung der Patient\*innen bzw. deren gesetzlichen Vertreter\*innen im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie (Begleitforschung) unter einem genehmigten Ethikantrag (Ethikvotum Nr. 2522 der Medizinischen Hochschule Hannover). Alle Patient\*innen wurden nach dem Protokoll der ALL-BFM 2000-Studie behandelt<sup>[91, 92]</sup>. Weitere Patientencharakteristika sind in Tab. 16 und Tab. 17 (3.5 bzw. 7) aufgeführt. Die Messung der Gal-3 Expressionslevel wurde durch Christian Pfeiffer (Doktorand der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH Kiel) durchgeführt.

### **2.2.16 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung zweier unterschiedlicher experimenteller Bedingungen wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test nach Student verwendet. Die Überlebenszeitdaten der Tierversuche wurde mittels Kaplan-Meier-Verfahren analysiert. Um dabei zwei Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der Log-rank-Test verwendet. Bei Verwendung weiterer statistischer Tests wurden diese im Folgenden in der Legende angegeben. Als einheitliches Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 5\%$  festgelegt. Signifikante Ergebnisse wurden bei  $p \leq 0,05$  mit einem Stern (\*), bei  $p \leq 0,01$  mit zwei Sternen (\*\*) und bei  $p \leq 0,001$  mit drei Sternen (\*\*\*) markiert.

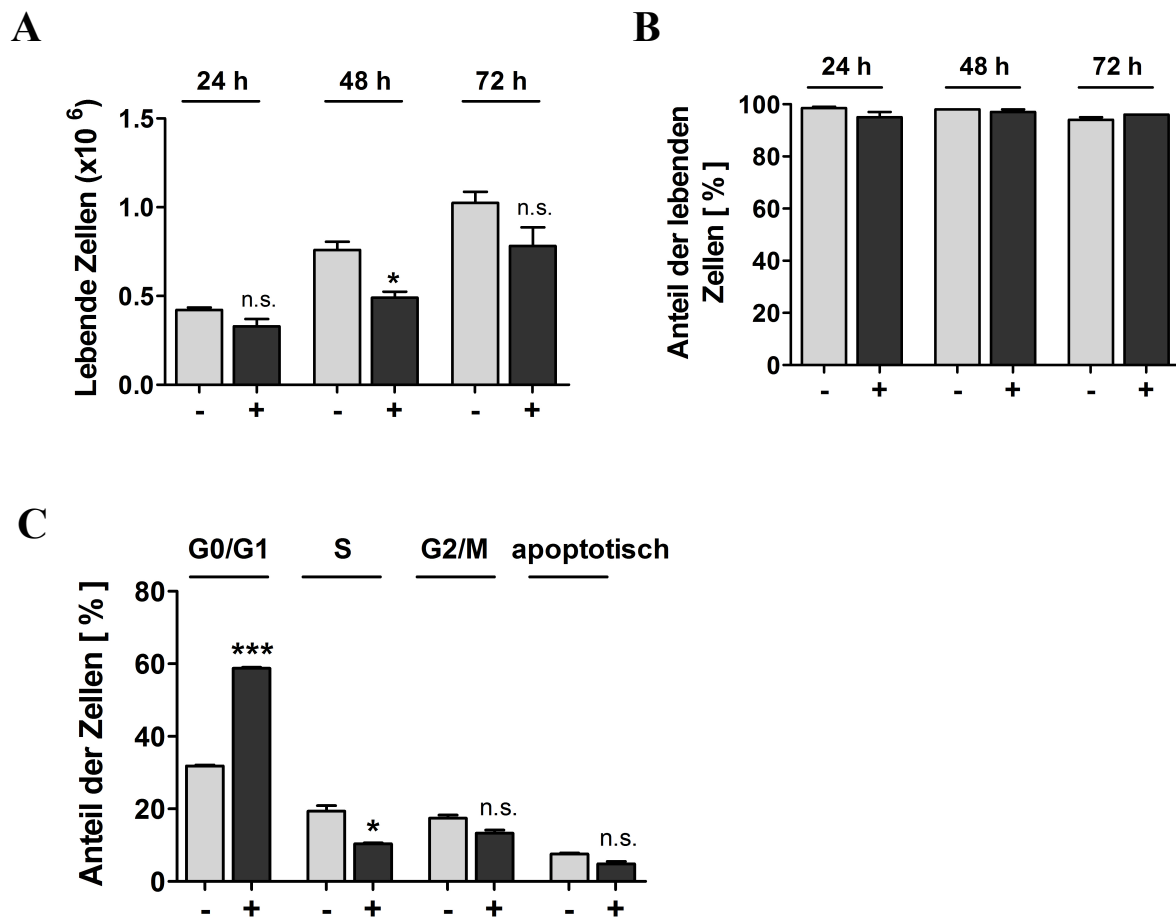
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Galectin-3 verstärkt den Wachstumsarrest von 697-Zellen im U343-Kokulturmodell

Es konnte gezeigt werden, dass die Mer-Expression mit einem Zustand der Quieszenz von B-Vorläufer-ALL-Zellen im ZNS-Modell korreliert<sup>[40]</sup>. Um die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu klären, sollte geprüft werden, ob für die Arrest-Induktion direkter Kontakt der Leukämie- und ZNS-Zellen notwendig ist oder ob seitens der Mikroumgebung sezernierte Faktoren den Arrest verursachen können. Dafür wurden 697-Zellen mit U343-konditioniertem Medium (2.2.4) kultiviert und deren Wachstumsverhalten analysiert. Dabei zeigte sich bei den in U343-konditioniertem Medium kultivierten 697-Zellen ein im Vergleich zu den Kontrollen verlangsamtes Wachstum (Abb. 4A). Bereits nach 24 h war die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen auf 78 % verringert. Am deutlichsten und statistisch signifikant war die Abnahme nach 48 h auf 64 %. Nach 72 h war die Zellzahl sichtbar auf 76 % verringert (Abb. 4A).

Da der Rückgang der Zellzahl nicht durch einen proportionalen Anstieg toter Zellen erklärt werden konnte (Anteil lebender Zellen in allen Wells zu jedem Kontrollzeitpunkt über 93 %) (Abb. 4B), deutet die geringere Zellzahl auf einen Wachstumsarrest hin. Um dies zu erhärten, wurde nach 72 h eine PI-Zellzyklusanalyse der 697-Zellen durchgeführt. Hier war bei den in konditioniertem Medium kultivierten Zellen ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus von 32 % auf knapp 59 % festzustellen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase war mit einer statistisch signifikanten Reduktion von 19 % auf 10 % fast halbiert (Abb. 4C), was einen Übergang der Zellen in einen Wachstumsarrest anzeigt.

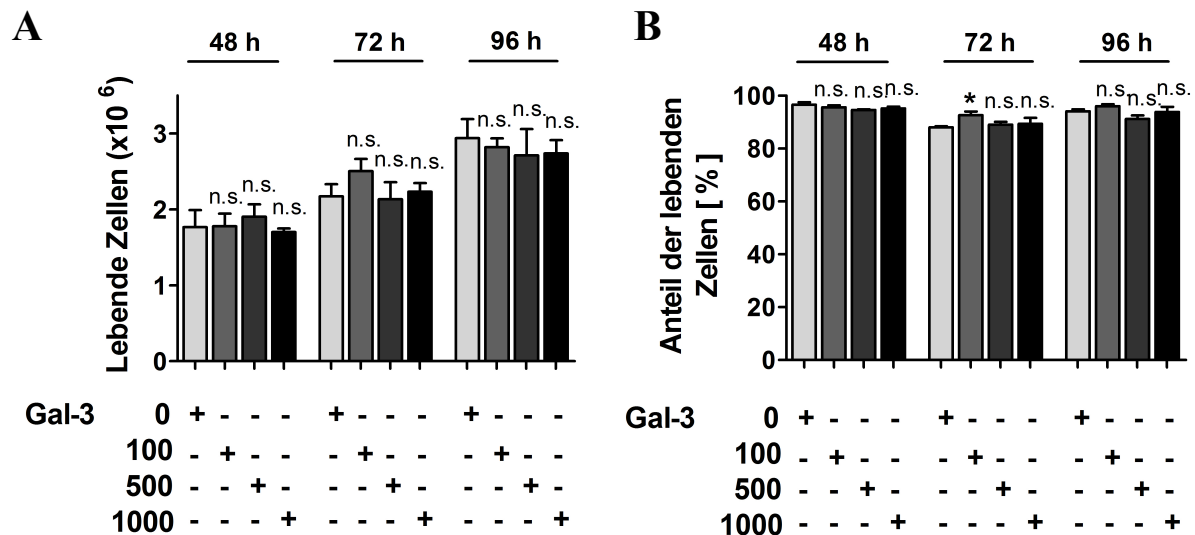
Insgesamt zeigte sich, dass ein Wachstumsarrest von 697-Zellen im U343-Kokulturmodell stattfindet, für den kein direkter Zellkontakt notwendig ist.



**Abb. 4: Die Kultivierung in U343-konditioniertem Medium führt zu einem Wachstumsarrest von 697-Zellen** | 697-Zellen wurden in U343-konditioniertem Medium (+) oder mit unkonditioniertem Medium (-) kultiviert (2.2.4). Trypanblau-Zählung nach 24 h, 48 h und 72 h. (A) Absolute Zahl der lebenden Zellen. (B) Anteil der lebenden Zellen. (C) Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid (PI) nach 72 h. Die 697-Zellen wurden nach ihrem DNA-Gehalt den Zellzyklusphasen zugeordnet: ruhende oder postmitotische Zellen mit einfachem DNA-Gehalt in die G0/G1 Phase, proliferierende Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt in die G2/M-Phase und Zellen mit sich gerade replizierender DNA in die S-Phase. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant (bezogen auf die Kontrollen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

Da sich in der U343-Kokultur ein Anstieg von sezerniertem Gal-3 zeigte<sup>[40]</sup>, sollte geprüft werden, ob Gal-3 für den Wachstumsarrest in 697-Zellen verantwortlich sein könnte. Dafür wurden 697-Zellen zunächst in Monokulturen mit rekombinantem Gal-3 in unterschiedlicher Konzentration behandelt. Anschließend wurden Wachstum und Viabilität der Zellen analysiert.

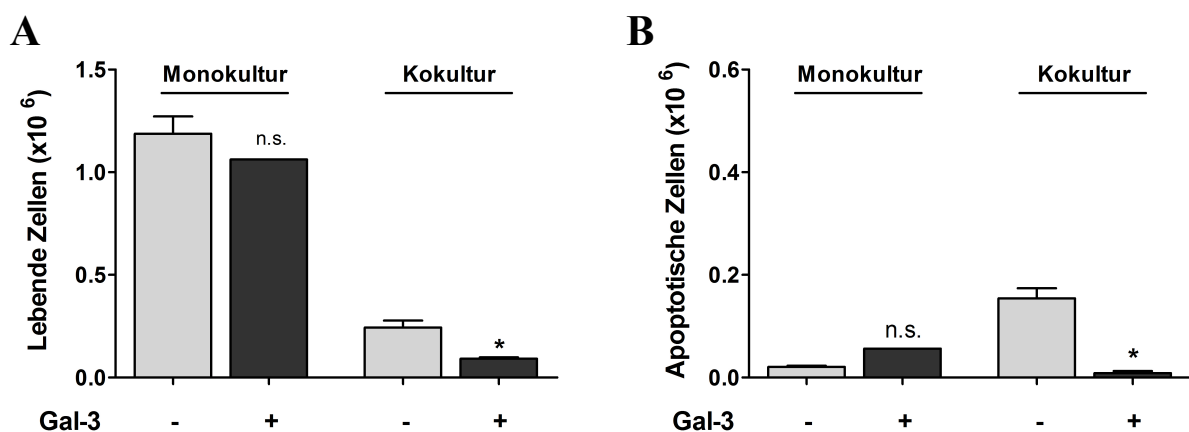




**Abb. 5: Rekombinantes Galectin-3 beeinflusste die Proliferation und Viabilität von 697-Zellen in Monokulturen nicht** | 697-Zellen wurden mit 0, 100, 500 oder 1000 ng/ml rekombinanten Gal-3 oder mit gleichem Volumen DEPC-Wasser behandelt. Nach 48 h, 72 h oder 96 h wurden Lebendzellzahl (A) und Zellviabilität (B) mittels Trypanblau-Zählung bestimmt. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

Die Stimulation von 697-Zellen mit exogen hinzugefügtem Gal-3 hatte keine Veränderung der Absolutzahl lebender Zellen (Abb. 5A) oder der Zellviabilität (Abb. 5B) zur Folge. Weder die Gal-3 Konzentration noch die Dauer der Stimulation beeinflusste das Wachstumsverhalten der monokultivierten Zellen.

Um den Einfluss von Gal-3 im U343-Kokulturmodell zu prüfen, wurden 697-Zellen in U343-Kokulturen (2.2.3) mit Gal-3 behandelt und ihr Wachstum sowie die Zellviabilität analysiert.



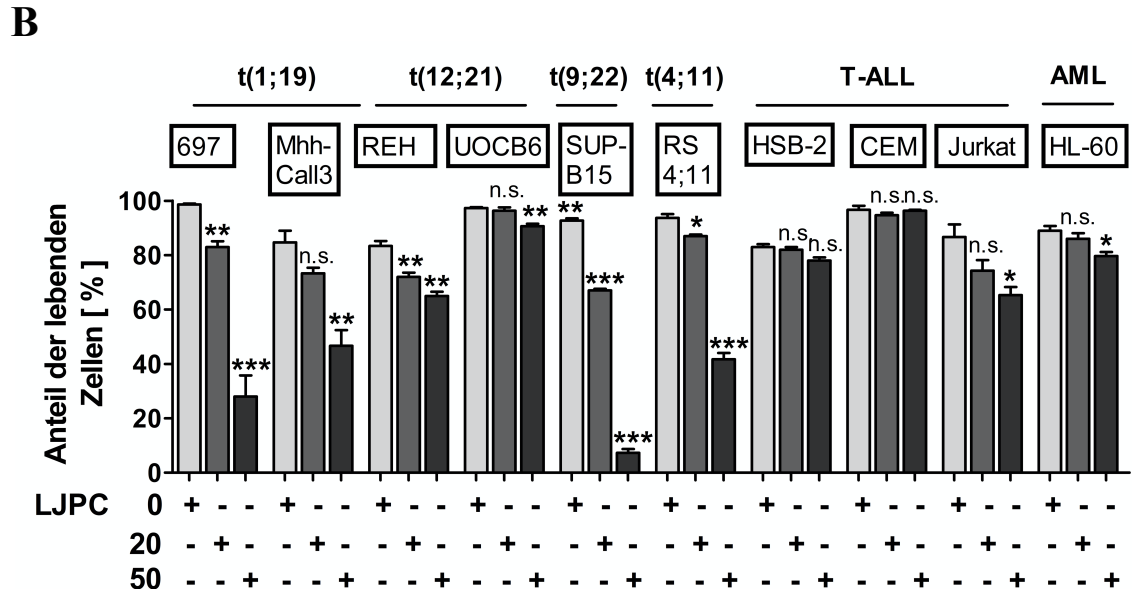
**Abb. 6: Im U343-Modell zeigt sich ein Wachstumsarrest von B-Vorläufer-ALL-Zellen, der durch Galectin-3 verstärkt wird** | Trypanblau-Zählung lebender (A) und toter (B) 697-Zellen nach 72 h Kokultivierung mit U343-Zellen. Die Zellen wurden bei Aussaat und nach je 24 h mit 2  $\mu$ g/ml rekombinanten Gal-3 behandelt (+). Als Kontrollen dienen DEPC-Wasser-behandelte (-) Kokulturen sowie auf die gleiche Weise behandelte Monokulturen. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant (bezogen auf die Kontrollen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

Die 697-Zellen in der Kokultur gingen wie vorbeschrieben in einen Wachstumsarrest über. Während die Zellzahl in der Monokulturkontrolle kaum verändert war, zeigte sich in der Kokultur unter der Behandlung mit Gal-3 eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 63 % gegenüber den unbehandelten Kokulturen (Abb. 6A). Bei der Analyse der Viabilität der 697-Zellen zeigte sich in der Kokultur eine signifikante Abnahme toter Zellen unter Gal-3 Behandlung (Abb. 6B), was einen Übergang der Zellen in den Zellzyklusarrest anzeigt.

Insgesamt zeigte sich, dass exogen zugefügtes Gal-3 allein nicht zu einem Wachstumsarrest von monokultivierten 697-Zellen führt (Abb. 5), in der U343-Kokultur den Wachstumsarrest jedoch verstärkt (Abb. 6). Dies deutet auf eine Rolle von Gal-3 in der ZNS-vermittelten Zellzyklusinhibition von B-Zell-Vorläufer-ALL-Zellen im 697/U343-Kokulturmodell hin.

### **3.2 Die Inhibition von Galectin-3 mit LJPC-1010 führt zu einer Reduktion der Viabilität von B-Vorläufer-ALL-Zellen**

Die am besten untersuchte, im Rahmen von Tumorerkrankungen relevante Wirkung von Gal-3 ist die Apoptoseregulation, wobei Gal-3 sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann<sup>[50, 51, 56, 57, 69, 93]</sup>. Nachdem im ZNS-Modell ein Mer-assoziiierter Überlebensvorteil leukämischer Zellen sowie eine Gal-3 Expressionssteigerung ermittelt wurde<sup>[40]</sup>, stellte sich die Frage, ob das Zellüberleben durch die Inhibition von Gal-3 reduziert werden kann. Dafür sollte Gal-3 mit dem niedermolekularen Inhibitor LJPC-1010<sup>[94]</sup> blockiert werden. Dieser ist dem modifizierte Citruspektin GCS-100 ähnlich<sup>[94]</sup>, welches bereits in präklinischen Modellen des Multiplen Myeloms<sup>[95, 96]</sup>, des Lymphoms<sup>[97]</sup>, der AML<sup>[98]</sup> und des DLBCL<sup>[99]</sup> verwendet wurde. Durch weitere Modifikation gilt LJPC-1010 als potenter und oral applizierbar<sup>[94]</sup>. Es wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet, um mögliche Effektunterschiede von LJPC-1010 auf Zelllinien mit unterschiedlichen Translokationen festzustellen. Neben sechs B-Vorläufer-ALL-Zelllinien wurden auch die T-ALL-Zelllinien HSB-2, CEM und Jurkat und die AML-Zelllinie HL-60 untersucht. Die verwendeten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien weisen unterschiedliche Chromosomentranslokationen auf, die wiederum in Patient\*innen mit sehr unterschiedlichen Prognosen assoziiert sein können (Abb. 7). Wie die Zelllinie 697 tragen auch die MHH-Call3-Zellen die Translokation t(1;19)<sup>[82, 100]</sup>, die bei 2-6 % der Patient\*innen im Kindesalter vorkommt und mit einer guten Prognose, aber einem erhöhten Risiko für ZNS-Rezidive assoziiert ist<sup>[23, 76]</sup>. Die Zelllinien REH und UOCB6 tragen die häufige Translokation t(12;21)<sup>[85, 101]</sup>, die bei 25 % der Erkrankten auftritt und mit einer günstigen Prognose assoziiert ist<sup>[76]</sup>. Die Zelllinie SUP-B15 trägt die BCR-ABL Translokation<sup>[102]</sup>, die im Kindesalter bei 2-4 % der Patient\*innen vorkommt<sup>[76]</sup> und die Zelllinie RS4;11 die Translokation t(4;11)<sup>[103]</sup>, die bei 1-2 % auftritt<sup>[76]</sup>. Sowohl die Translokation t(9;22) als auch die Translokation t(4;11) sind mit einer schlechten Prognose und einem erhöhtem Risiko für ZNS-Rezidive assoziiert<sup>[15]</sup>.



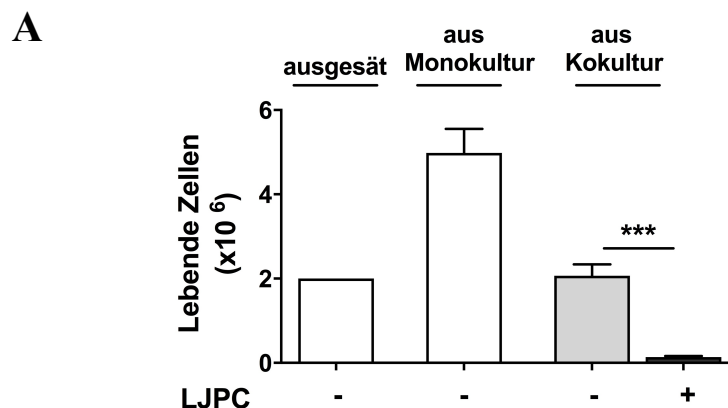
**Abb. 7: Die Inhibierung von Galectin-3 verringert die Viabilität von B-Vorläufer-ALL-Zellen *in vitro*** | Die in der Grafik genannten Zelllinien wurden mit DEPC-Wasser (-), 20 µg/ml oder 50 µg/ml LJPC-1010 (+) behandelt. Nach 48 h (A) und 72 h (B) wurde die Zellviabilität mittels Trypanblau-Zählung bestimmt. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001; n.s. = nicht signifikant (bezogen auf die Kontrollen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

Nach 48 h war die Zellviabilität der t(9;22)<sup>+</sup> SUP-B15-Zellen, der t(1;19)<sup>+</sup> 697-Zellen, der t(4;11)<sup>+</sup> RS4;11-Zellen und der T-ALL-Zelllinie Jurkat unter Behandlung mit LJPC-1010 signifikant reduziert (Abb. 7A). Die stärkste Verringerung der Zellviabilität zeigte sich nach 72 h. Mit 50 µg/ml LJPC-1010 inkubierte 697-Zellen wiesen eine im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant auf 28 % reduzierte Zellviabilität auf, die Viabilität von MHH-Call3-Zellen war signifikant auf 55 % reduziert, die der RS4;11-Zellen signifikant auf 44 % und die der SUP-B15 Zellen signifikant auf

8 % (Abb. 7B). Weniger stark war die Reduktion der  $t(12;21)^+$  Zelllinien REH und UOCB6, der T-ALL-Zelllinie Jurkat und der AML-Zelllinie HL-60, deren Zellviabilität auf 78 %, 93 %, 75 %, bzw. 89 % (in gleicher Reihenfolge) reduziert war. Die T-ALL-Zelllinien HSB-2 und CEM zeigten keine signifikanten Veränderungen unter Behandlung.

Insgesamt war die Zellviabilität der untersuchten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien unter der Behandlung mit LJPC-1010 deutlich verringert, während sie bei den T-ALL-Zelllinien mit Ausnahme der Jurkat-Zellen kaum verändert war. Am stärksten war die Reduktion bei Zellen mit der Translokation  $t(1;19)^+$ , sowie  $t(4;11)^+$  und  $t(9;22)^+$ , die mit einer schlechten Prognose und einem hohen ZNS-Rezidivrisiko assoziiert sind<sup>[76]</sup>.

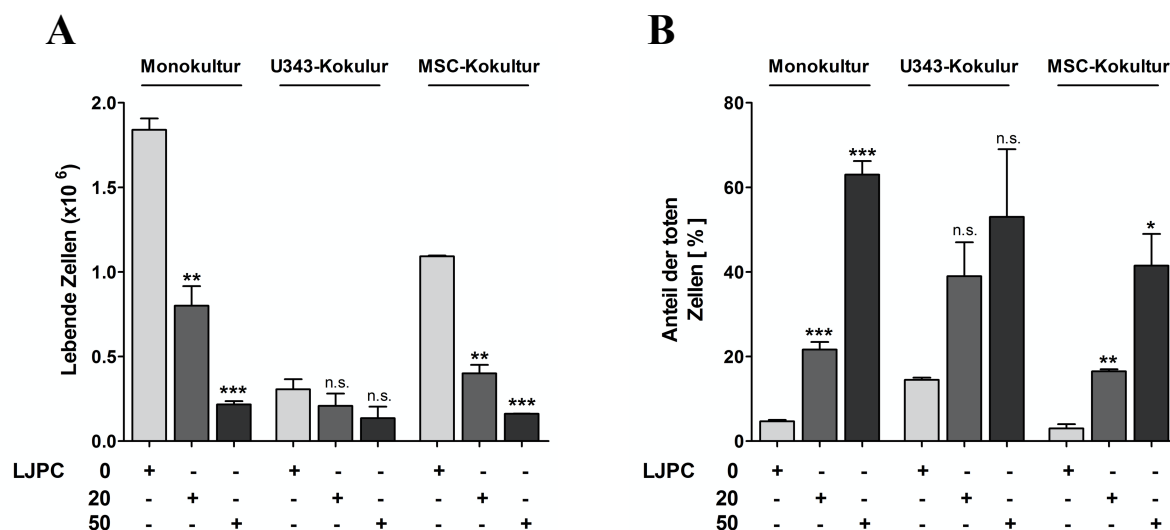
Daran anknüpfend sollte geprüft werden, ob eine Behandlung mit LJPC-1010 auch mit einer reduzierten Viabilität einhergeht, wenn sich B-Vorläufer-ALL-Zellen in einem Zustand des Zellzyklusarrests befinden. Dafür wurden 697-Zellen zur Induktion des Arrests für 48 h mit U343-Zellen kokultiviert und anschließend durch magnetische Zellseparation wieder getrennt. Da 697-Zellen nach der Isolierung für min. 144 h im Zellzyklusarrest verbleiben<sup>[40]</sup>, konnten sie im wachstumsarrestierten Zustand mit LJPC-1010 behandelt werden.



**Abb. 8: LJPC-1010 führt auch bei wachstumsarrestierten 697-Zellen zu einer Reduktion der Viabilität** | Trypanblau-Zählung lebender 697-Zellen. Für die Behandlung von Zellen im Zellzyklusarrest wurden zunächst U343-Kokulturen angelegt, wobei  $2 \times 10^6$  697-Zellen ausgesät wurden (Balken 1). Als Kontrolle des normalen Wachstumsverhaltens der 697-Zellen wurden Zellen in gleicher Dichte in Monokultur ausgesät (Balken 2). Die in Kokultur kultivierten Zellen wurden nach 48 h mittels magnetischer Zellseparation durch Markierung mit CD45 Microbeads (2.2.5) isoliert und für 72 h mit 50  $\mu\text{g/ml}$  LJPC-1010 (+) oder DEPC-Wasser (-) behandelt (Balken 3 und 4). \*\*\* $p \leq 0,001$ . Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

Unter der Behandlung mit 50  $\mu\text{g/ml}$  LJPC-1010 war im Vergleich zu den Kontrollen eine statistisch signifikante Abnahme der lebenden 697-Zellen auf 7 % festzustellen (Abb. 8). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Behandlung mit LJPC-1010 zu einer Einschränkung der Viabilität von 697 Zellen führt, die sich im Wachstumsarrest befinden.

In einem weiteren Kokulturmodell sollte untersucht werden, ob es bei B-Vorläufer-ALL-Zellen auch in Gegenwart von Zellen des Mikromilieus im Knochenmark zu einer Reduktion der Zellviabilität unter Gal-3 Inhibition kommt. Dafür wurde die ZNS-Nische durch Kokultivierung von 697-Zellen mit U343-Zellen modelliert. Eine MSC-Zelllinie wurde stellvertretend für die Bedingungen im Knochenmark verwendet. Die Zellen wurden mit LJPC-1010 behandelt, anschließend wurde die Zellviabilität analysiert.



**Abb. 9: Auch im *in vitro* ZNS- und Knochenmarkmodell führt LJPC-1010 zu einer Reduktion der Viabilität von 697-Zellen** | Trypanblau-Zählung von 697-Zellen, die in U343- und MSC-Kokulturen, sowie in Monokulturen kultiviert und mit 20 µg/ml oder 50 µg/ml LJPC-1010 (+) oder als Kontrolle mit DEPC-Wasser (-) behandelt wurden. (A) Zahl der lebenden 697-Zellen nach 48 h. (B) Anteil der toten 697-Zellen nach 48 h. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant (bezogen auf die Kontrollen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten.

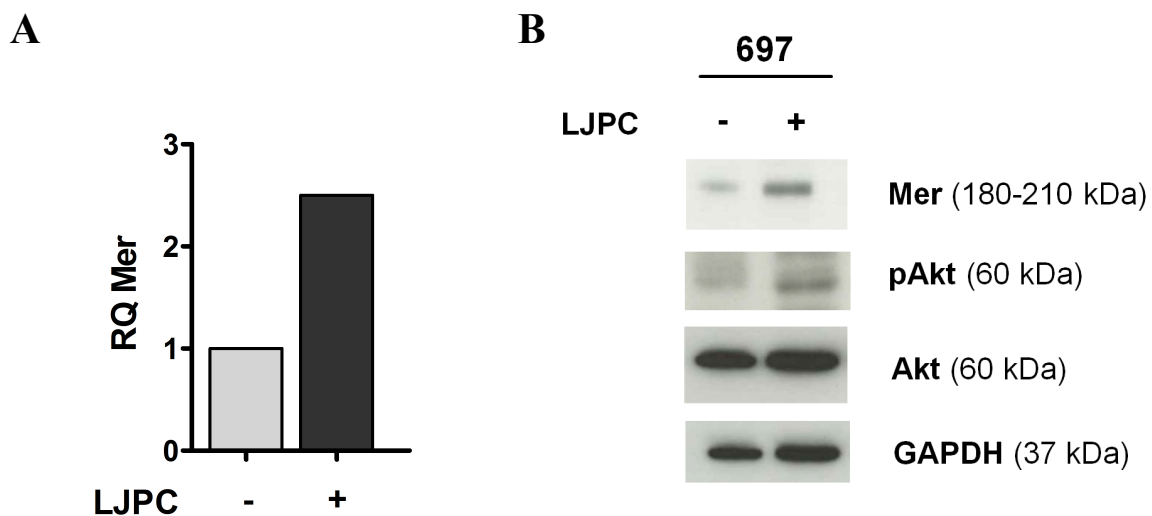
Nach 48 h zeigte sich das bekannte verlangsamte Wachstum der 697-Zellen in Kokultur gegenüber den in Monokultur kultivierten Kontrollen (Abb. 9A). Bei Galectin-Inhibition mit 50 µg/ml LJPC-1010 war in der U343-Kokultur eine deutliche, statistisch jedoch nicht signifikante, Reduktion der lebenden 697-Zellen auf 45 % der Kontrollen erkennbar. In der MSC-Kokultur war die Lebendzellzahl bei gleicher Konzentration statistisch signifikant auf 15 % gegenüber den Kontrollen reduziert. Der Rückgang der Zellzahl ging mit einem proportionalen Anstieg toter Zellen einher (Abb. 9B), was anzeigt, dass die 697-Zellen nicht verstärkt in einen Arrest übergangen, sondern es bei der Behandlung mit LJPC-1010 vermehrt zum Zelltod kam.

Insgesamt war die Behandlung mit LJPC-1010 *in vitro* mit einem vermehrten Zelltod von monokultivierten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien, insbesondere der Zelllinien 697, MHH-Call3, SUP-B15 und RS4;11, verbunden (Abb. 7). An 697-Zellen zeigte sich bei Behandlung mit LJPC-1010 zudem eine Reduktion der Viabilität von Zellen im Zellzyklusarrest (Abb. 8) und von Zellen in der das Mikromi-

lieu des Knochenmarks modellierenden MSC-Kokultur und in der das Mikromilieu des ZNS modellierenden U343-Kokultur (Abb. 9A).

### 3.3 Die Galectin-3/Mer-Feedback-Achse

Um einer möglichen Assoziation von Mer und Gal-3 in B-Vorläufer-ALL-Zellen nachzugehen, wurden 697-Zellen *in vitro* mit LJPC-1010 behandelt, anschließend wurde ihre Mer-Expression auf mRNA- und Proteinebene analysiert.

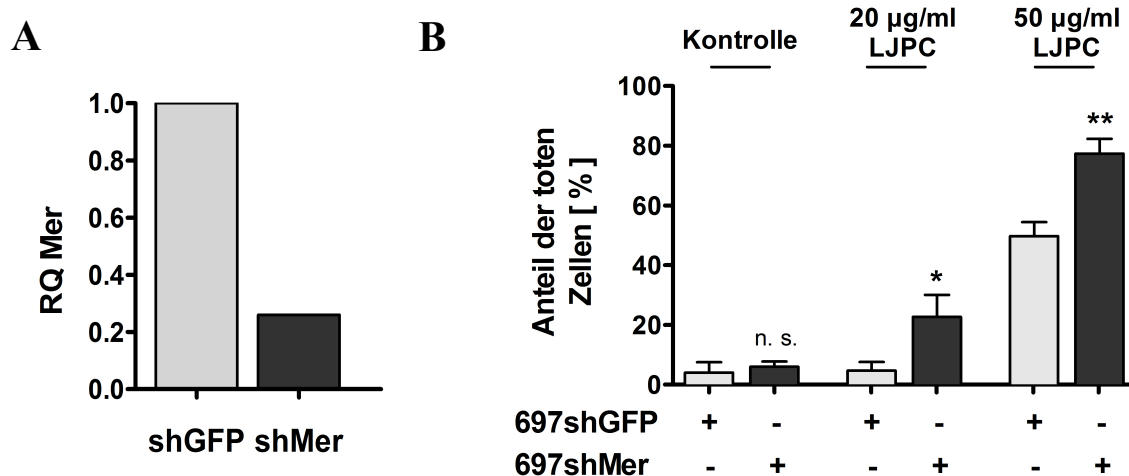


**Abb. 10: Die Behandlung von Leukämiezellen mit LJPC-1010 führt zu einer Induktion von Mer** | 697-Zellen wurden für 48 h mit 50 µg/ml (A) / 20 µg/ml (B) LJPC-1010 inkubiert. (A) Mittels qPCR analysierte Expression von Mer auf mRNA-Ebene. RQ = relative Quantifikation (relative Mer-Expression im Vergleich zu dem Kalibrator, unbehandelte 697-Zellen). (B) Mittels Western Blot analysierte Expression von Mer auf Proteinebene. GAPDH bezeichnet die verwendete Ladekontrolle; kDa = Kilodalton (relative Molekülmasse der analysierten Proteine).

Bei der qPCR-Analyse der Mer-Expression auf mRNA-Ebene zeigte sich unter Behandlung mit dem Galectin-Inhibitor eine Erhöhung der Mer-Expression auf das Zweieinhalbfache gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 10A). Mittels Western Blot wurden auf Proteinebene sowohl Mer als auch der nachgeschaltete Akt-Signalweg, der verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, -überleben und -stoffwechsel reguliert<sup>[40, 104]</sup>, untersucht. Hier zeigte sich eine erhöhte Expression von sowohl Mer als auch phosphoryliertem Akt (Abb. 10B).

Weiter wurde geprüft, ob die Mer-Expression von B-Vorläufer-ALL-Zellen eine Rolle für die Viabilität unter der Behandlung mit LJPC-1010 spielt. Dafür wurde Mer in 697-Zellen mittels lentiviraler shRNA Vektorkonstrukten herunterreguliert (Abb. 11A). Die Zellen wurden mit LJPC-1010 behandelt, nach 48 h wurde der Anteil toter Zellen analysiert (Abb. 11B). Dabei zeigte sich, dass 697-Zellen

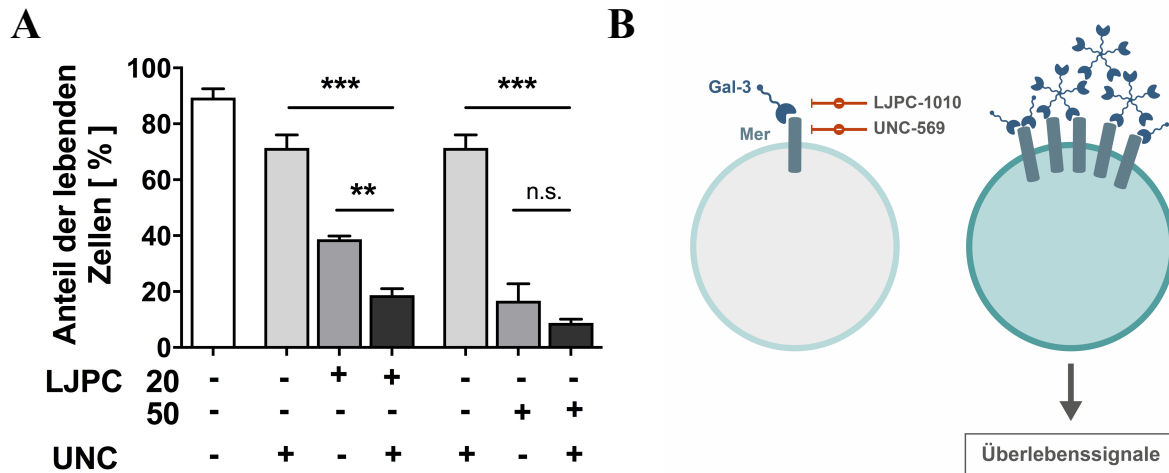
mit spezifischem Mer-Knockdown (697shMer) verglichen mit den Kontrollen (697shGFP) sensibler auf LJPC-1010 waren. Bei den 697shGFP-Zellen veränderte sich unter der Behandlung mit 20 µg/ml LJPC-1010 der Anteil toter Zellen nicht, 697shMer-Zellen wiesen jedoch eine signifikante Erhöhung toter Zellen auf 20 % auf (Abb. 11B). Nach Behandlung mit 50 µg/ml LJPC-1010 war der Anteil toter 697shMer-Zellen mit 77 % im Vergleich zu den Kontrollen mit 50 % signifikant vergrößert.



**Abb. 11: 697-Zellen mit verminderter Mer-Expression zeigen eine erhöhte Sensibilität auf eine Behandlung mit dem Galectin-3 Inhibitor LJPC-1010** | (A) Nachweis des Mer-Knockdowns mittels qPCR. RQ = relative Quantifikation (relative Mer-Expression im Vergleich zu dem Kalibrator, 697shGFP-Zellen). (B) 697-Zellen mit shRNA-vermitteltem Knockdown von Mer (697shMer) und mit Kontrollvektor transfizierte 697-Zellen (697shGFP) wurden mit DEPC-Wasser (Kontrolle), 20 µg/ml oder 50 µg/ml LJPC-1010 inkubiert. Trypanblau-Zählung nach 48 h. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001; n.s. = nicht signifikant (bezogen auf die Kontrollen).

Daraufhin sollte untersucht werden, ob analog zu dem gezeigten shRNA-vermittelten Knockdown auch der für die Inhibition von Mer in 697-Zellen wirksame<sup>[40]</sup> kleinmolekulare Inhibitor UNC-569 zu einer erhöhten Zelltod-Induktion bei LJPC-1010 Behandlung führt. Dafür wurde die Zellviabilität von 697-Zellen nach 72 h Inkubation mit UNC-569 oder LJPC-1010 alleine bzw. mit einer Kombination beider Inhibitoren analysiert. Bei der Behandlung mit UNC-569 sank die Viabilität der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auf 80 % (Abb. 12A). Wurden Zellen gleichzeitig mit 20 µg/ml LJPC-1010 behandelt, sank die Zellviabilität signifikant auf 26 % im Vergleich zu den nur mit UNC-569 behandelten Zellen. Bei gleichzeitiger Behandlung mit 50 µg/ml LJPC-1010 war die Viabilität der Zellen im Vergleich zur UNC-569-Monotherapie signifikant auf 12 % reduziert. Bei der Analyse der Zellviabilität bei LJPC-1010-Monotherapie zeigte sich bei der Behandlung mit 20 µg/ml LJPC-1010 eine Reduktion der Zellviabilität auf 43 % im Vergleich zu den mit DEPC-Wasser behandelten Kontrollen und auf 19 % bei einer Behandlung mit 50 µg/ml LJPC-1010. Bei der Kombination mit UNC-569 verringerte sich die Zellviabilität weiter auf 52 % im Vergleich zur Monotherapie. Es zeigte sich, dass es bei einer *in vitro* LJPC-1010 Behandlung von 697-Zellen in den ge-

wählten Konzentrationen zu einer stärkeren Viabilitätsreduktion kommt als bei der Behandlung mit 800 nM UNC-569. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Inhibitoren mit der stärksten Zelltodinduktion einhergeht.



**Abb. 12: Die Kombination von LJPC-1010 mit dem Mer-Inhibitor UNC-569 verstärkt die Zelltodinduktion behandelter 697-Zellen** | (A) 697-Zellen wurden in Mono- oder Kombinationstherapie mit 800 nM UNC-569, 20 µg/ml oder 50 µg/ml LJPC-1010 behandelt. Nach 72 h wurde die Zellviabilität durch Trypanblau-Zählung bestimmt. Als Kontrolle wurden 697-Zellen mit DEPC-Wasser oder DMSO behandelt. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in 3 Experimenten. (B) Übersicht der verwendeten kleinenmolekularen Inhibitoren LJPC-1010 und UNC-569.

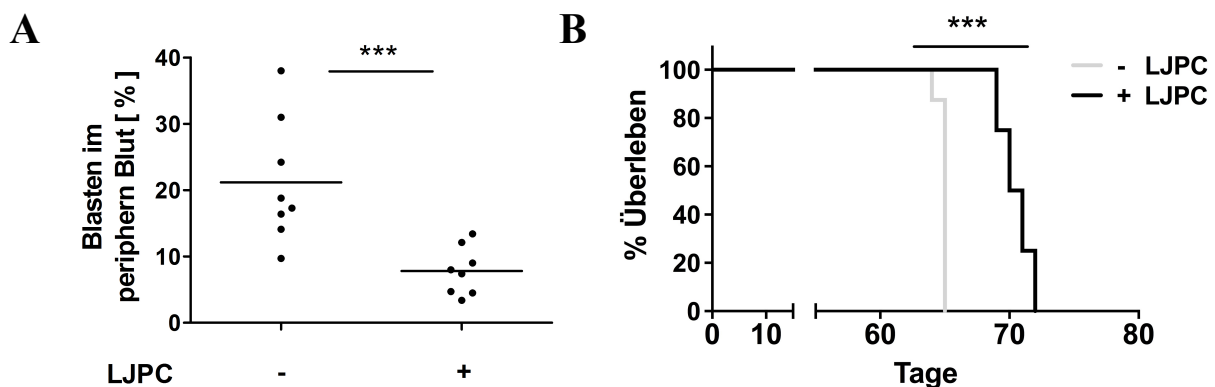
Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung mit LJPC-1010 in 697-Zellen zu einer Induktion von Mer und dem Mer assoziierten Akt-Signalweg führt (Abb. 10) und sowohl bei 697-Zellen mit Mer-Knockdown (Abb. 11), als auch bei Kombinationsbehandlung mit UNC-569 (Abb. 12) vermehrt Zelltod induziert. Dies deutet für die untersuchten Zellen eine Vermittlung von Überlebenssignalen durch ein Zusammenspiel von Gal-3 und Mer, möglicherweise im Rahmen eines Feedback-Mechanismus, an.

### 3.4 Oral verabreichtes LJPC-1010 führt im murinen Xenograftmodell zu einem verzögerten Ausbruch der Leukämie und zu verlängerten Überlebenszeiten bei unveränderter ZNS-Infiltration

Um die Auswirkungen von LJPC-1010 *in vivo* zu untersuchen, wurden 16 NSG-Mäusen Leukämiezellen einer Patientin mit  $t(1;19)^+$  B-Vorläufer-ALL transplantiert. Eine Versuchstiergruppe wurde vom Zeitpunkt der Zellinjektion an wöchentlich fünfmal mittels Magenschlundsonde mit je 0,2 mg LJPC-1010 behandelt, während eine Kontrollgruppe unbehandelt blieb. Es wurde geprüft, ob die Behandlung den Ausbruch der ALL oder das Überleben der Versuchstiere verändert. Sechs Wochen nach

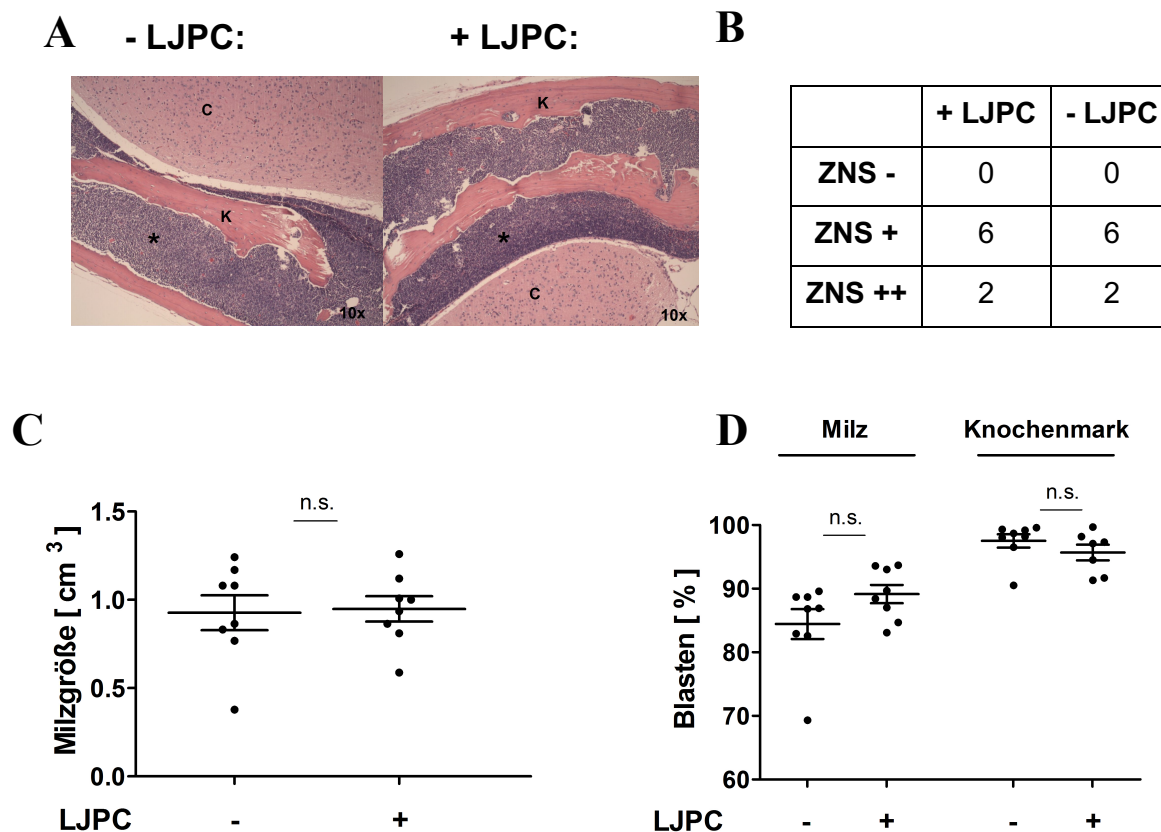


der Xenotransplantation wurde die Last humaner Leukämiezellen im peripheren Blut der Versuchstiere untersucht. Dabei zeigte sich bei den behandelten Tieren ein signifikant geringerer Anteil leukämischer Zellen von 37 % gegenüber den Kontrolltieren ( $p = 0,0006$ ) (Abb. 13A). Bei der Überlebenszeitanalyse zeigte sich eine geringe, aber statistisch signifikante, Verlängerung der Überlebenszeiten der mit LJPC-1010 behandelten Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren ( $p = 0,0001$ ) (Abb. 13B). Die mediane Überlebenszeit dieser Gruppe lag bei 71 Tagen, während die der Kontrollgruppe bei 65 Tagen lag.



**Abb. 13:** Im ALL-Xenograft-Modell zeigen sich bei Behandlung mit LJPC-1010 ein verzögerter Ausbruch der Leukämie sowie leicht verlängerte Überlebenszeiten der Versuchstiere | 16 Mäusen wurden Zellen aus einer diagnostischen Knochenmarkprobe einer  $t(1;19)^+$  ALL vom Diagnosezeitpunkt transplantiert. Vom Tag der Leukämiezellinjektion an wurden die Tiere fünfmal wöchentlich mittels Magenschlundsonde mit 0,2 mg à 50  $\mu$ l LJPC-1010 (+,  $n=8$ ) behandelt oder erhielten keine Therapie (-,  $n=8$ ). **(A)** Anteil leukämischer Blasten im peripheren Blut, festgestellt durch durchflusszytometrische Bestimmung  $mCD45^+hCD45^+hCD19^+$  Zellen sechs Wochen nach Leukämiezellinjektion. **(B)** Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse. Als Endpunkt wurde der bei klinischen Symptome einer akuten Leukämie (Aktivitätsverlust, Gewichtsverlust, Organomegalie, schwache Parese der hinteren Extremität) oder bei einer Blastenlast von  $> 75$  % durch tierschutzgerechte Euthanasie herbeigeführte Tod definiert. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob sich durch die Behandlung mit LJPC-1010 auch die Leukämielast im ZNS verringern lässt. Während eine Xenograft-Gruppe fünfmal wöchentlich oral 0,2 mg LJPC-1010 erhielt, erhielt die Kontrollgruppe keine Therapie. Alle Mäuse wurden, sobald das erste Kontrolltier Symptome einer Leukämie zeigte, zum gleichen Zeitpunkt euthanasiert. Die Infiltration des ZNS durch leukämische Zellen wurde anhand HE-gefärbter histologischer Schnitte des Tierkopfes bestimmt und semiquantitativ in negativ (-), intermediär (+) und hoch (++) eingestuft (2.2.14). Außerdem wurde die leukämische Infiltration der Milz und des Knochenmarks analysiert. Dafür wurde post mortem in beiden Versuchstiergruppen die Größe der Milz vermessen und der Anteil leukämischer Zellen in Milz und Knochenmark bestimmt (2.2.14).



**Abb. 14: Die Behandlung mit LJPC-1010 zeigt keinen Einfluss auf die ZNS-Infiltration im ALL-Xenograft-Modell** | 16 Mäusen wurden Zellen aus einer diagnostischen Knochenmarkprobe einer  $t(1;19)^+$  ALL vom Diagnosezeitpunkt transplantiert. Vom Tag der Leukämiezellinjektion an wurden die Tiere fünfmal wöchentlich mittels Magenschlundsonde mit 0,2 mg à 50  $\mu$ l LJPC-1010 (+, n=8) behandelt oder erhielten keine Therapie (-, n=8). **(A)** Repräsentative Aufnahmen Hämatoxylin-Eosin-gefärbter ZNS-Schnitte eines Versuchstieres der mit LJPC-1010 behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Vergrößerung: 10  $\times$ . C = Cerebrum, K = Knochen, \* = leukämische Infiltration. **(B)** Histopathologisch beurteilte Leukämielast im ZNS der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe; ZNS - = negativ, ZNS + = intermediär, ZNS ++ = hoch. **(C)** Post mortem gemessene Milzgröße der Versuchstiere. **(D)** Anteil leukämischer Blasten in Milz und Knochenmark, post mortem festgestellt mittels durchflusszytometrischer Bestimmung mCD45<sup>+</sup>/hCD45<sup>+</sup>/hCD19<sup>+</sup> Zellen.

Bei der Betrachtung der histologischen Sektionen des ZNS zeigte sich bereits bei allen Tieren eine deutliche Infiltration (Abb. 14). Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen, sowohl in der mit LJPC-1010 behandelten als auch in der Kontrollgruppe wurden sechs Tiere als „+“ und zwei als „++“ eingestuft (Abb. 14B). Die Beteiligung des ZNS konnte im Xenograft-Mausmodell nicht durch eine orale Therapie mit LJPC-1010 verhindert werden. Bei der Analyse der leukämischen Infiltration der Milz zeigten sich weder bei der Milzgröße (Abb. 14C) noch bei dem Anteil leukämischer Blasten in der Milz (Abb. 14D) signifikante Unterschiede zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Auch die Infiltration des Knochenmarks war nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 14D).

Insgesamt zeigen die Befunde Auswirkungen von LJPC-1010 auf humane  $t(1;19)^+$  Leukämiezellen im Xenograft-Mausmodell. Während oral verabreichtes LJPC-1010 die Ausbreitung der Erkrankung verzögern (Abb. 13A) und die Überlebenszeit leicht verlängern (Abb. 13B) kann, wurde die Organinfiltration und die Beteiligung des ZNS im Verlauf der Erkrankung nicht verhindert (Abb. 14).

### **3.5 In der untersuchten Kohorte $t(1;19)^+$ ALL-Patient\*innen ist die Galectin-3 Expression in Knochenmarkproben als prognostischer Marker ungeeignet**

Um eine ZNS-gerichtete, dem individuellen Risikoprofil einzelner Patient\*innen angepasste Therapie zu ermöglichen, werden angesichts der derzeitigen ungenügenden Diagnostik (1.1) Marker benötigt, die eine genauere Aussage über die Beteiligung des ZNS bei Diagnosestellung sowie deren weitere Entwicklung erlauben. Um Gal-3 als Marker eines bereits erfolgten oder zu erwartenden ZNS-Befalls zu prüfen, wurden in einer Kohorte  $t(1;19)^+$  ALL-Patient\*innen die Expressionslevel in Knochenmarkproben vom Erstdiagnosezeitpunkt gemessen. Wie in der gleichen Patientenkohorte für die Expressionslevel von Mer bereits beschrieben<sup>[40]</sup>, wurde die Expression anhand des Medians in Galectin-hoch und Galectin-niedrig eingeteilt und anschließend mit unterschiedlichen klinischen Parametern korreliert. Zu den zum Diagnosezeitpunkt relevanten Faktoren zählen Alter, Geschlecht, Leukozytenzahl und ZNS-Status. Später sind das Ansprechen auf Glukokortikoide, welches am Tag 8 der Therapie durch Feststellung der Blastenlast im Blut gemessen wird, und die submikroskopische Beurteilung der MRD im Verlauf der Therapie wichtige prognostische Größen<sup>[5]</sup>. Zur Beurteilung der Beteiligung des ZNS zum Diagnosezeitpunkt wurden neben dem ZNS-Status auch die Leukozytenzahl im Liquor sowie die Anwesenheit von Blasten im Liquor-Zytospin bei der diagnostischen Lumbalpunktion zum Diagnosezeitpunkt analysiert. Alle analysierten Parameter sowie die entsprechende Verteilung der Gal-3 Expressionslevel sind in Tab. 16 aufgeführt.

Es ist zu erkennen, dass in der analysierten Kohorte nur zwei der Erkrankten ein Rezidiv erlitten, was die gute Prognose der ALL mit der Translokation  $t(1;19)$  bei der Primärerkrankung widerspiegelt. In dieser Gruppe zeigten sich keine Korrelationen mit den analysierten Parametern. Anhand der untersuchten Kohorte ist demnach nicht davon auszugehen, dass die Gal-3 Expressionslevel in Knochenmarkproben von  $t(1;19)^+$  Patient\*innen zum Zeitpunkt der ALL-Diagnosestellung als prognostische Marker zur Therapieplanung genutzt werden können.

**Tab. 16: Die Gal-3 Expressionslevel bei Erstdiagnose korrelieren nicht mit klinischen Parametern bei 60 an t(1;19)<sup>+</sup> ALL erkrankten Kindern und Jugendlichen**

	Gal-3 niedrig (n=30)	Gal-3 hoch (n=30)	p
<b>Geschlecht<sup>*</sup></b>			0,3275
männlich	16	11	
weiblich	14	19	
<b>Alter bei Erstdiagnose<sup>**</sup></b>			
< 10 Jahre	18	14	0,4379
≥ 10 Jahre	12	16	
<b>Anzahl initialer Leukozyten<sup>1**</sup></b>			0,7743
< 10 000	5	3	
10 000 - 50 000	15	15	
50 000 - 100 000	4	5	
≥ 100 000	4	2	
<b>Prednisone response<sup>2*</sup></b>			0,2990
PRED-GR	27	23	
PRED-PR	3	7	
<b>Risikogruppe nach MRD<sup>3**</sup></b>			0,5990
Standardrisiko	13	11	
Mittleres Risiko	13	12	
Hochrisiko	4	7	
<b>Mittelwert (Wertebereich) der Leukozyten im Liquor an Tag 0<sup>4***</sup></b>	8.1 (0-142)	3.6 (0-65)	0,4819
<b>Blasten im Liquor-Zytospin<sup>*</sup></b>			0,4420
nein	17	21	
ja	13	9	
<b>ZNS-Status<sup>5**</sup></b>			0,8465
ZNS1	17	19	
ZNS2	10	8	
ZNS3 (ZNS3c)	3 (1)	3 (3)	
<b>Rezidiv und Tod<sup>*</sup></b>			1
nein	29	29	
ja	1	1	

**Erläuterungen:** \*Exakter Fisher Test, einseitig; \*\*Chi-Quadrat-Test; \*\*\*Mann-Whitney-Test, zweiseitig;

<sup>1</sup>n=7 keine Angabe; <sup>2</sup> Prednisone Good Response (PRED-GR): < 1000 Blasten/μL bei der zytologischen Bewertung des Blastenteils im Blutausschlag nach der ersten Therapiewoche (nur Prednison 60 mg/m<sup>2</sup>/d und eine Gabe intrathekales Methotrexat); Prednisone Poor Response (PRED-PR): > 1000 Blasten/μL;

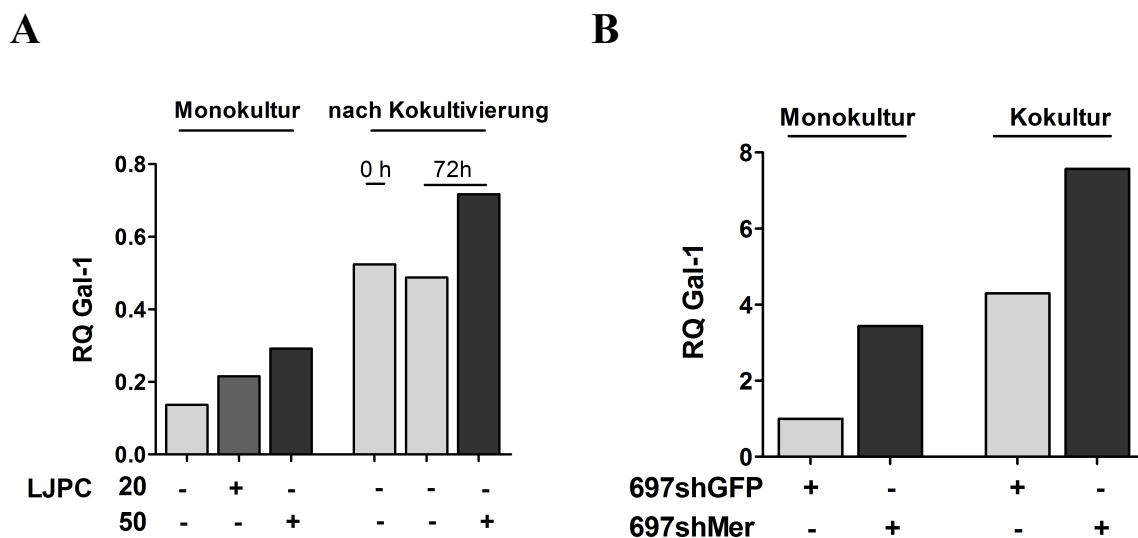
<sup>3</sup> Standardrisiko = keine MRD-Last an Tag 33 (Zeitpunkt R1) und Tag 78 (R2); Mittleres Risiko = MRD-Last < 10<sup>3</sup> an R1 und/oder R2; Hochrisiko = R2 ≥ 10<sup>3</sup>;

<sup>4</sup>n = 1 keine Angabe; Gal-3 niedrig (n=29) Median:1; Gal-3 hoch (n=30) Median: 1;

<sup>5</sup> ZNS1 = keine klinischen oder radiologische Zeichen eines ZNS-Befalls und keine leukämischen Blasten im Liquor-Zytospin; ZNS2 = keine klinischen oder radiologische Zeichen eines ZNS-Befalls; ZNS2a = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl ≤ 5/μl und Erythrozytenzahl ≤ 10/μl ohne makroskopisch sichtbares Blut; ZNS2b = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl ≤ 5/μl und Erythrozytenzahl ≥ 10/μl und/oder makroskopisch sichtbares Blut; ZNS2c = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl > 5/μl und Erythrozytenzahl ≥ 10/μl und/oder makroskopisch sichtbares Blut, aber erfüllt, wenn (Leukozytenzahl<sup>L</sup>/Erythrozytenzahl<sup>L</sup>) / (Leukozytenzahl<sup>B</sup>/Erythrozytenzahl<sup>B</sup>) > 2; ZNS3 – ZNS3a = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl > 5/μl und Erythrozytenzahl < 10/μl ohne makroskopisch sichtbares Blut; ZNS3c = klinisch oder radiologisch detektierbarer ZNS-Befall oder retinale Beteiligung.

### 3.6 Die Inhibition von Galectin-3 sowie die Herunterregulierung von Mer erhöhen die Galectin-1 Expression in 697-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Inhibition von Gal-3 *in vitro* zu einer reduzierten Viabilität von B-Vorläufer-ALL-Zellen (Abb. 7) und im Xenograft-Mausmodell zu einem leicht verlängerten Überleben (Abb. 13B) kommt. Der ZNS-Befall konnte mit der angewandten Applikationsform jedoch nicht verringert werden (Abb. 14B) und auch diagnostisch oder prognostisch zeigte sich in der untersuchten t(1;19)<sup>+</sup> Patientenkohorte keine Signifikanz (Tab. 16). Deswegen stellte sich die Frage, ob neben Gal-3 auch weitere Galectine mit ähnlicher Struktur und Funktion für leukämisches Überleben in der ZNS-Nische relevant sein könnten. Da die Inhibition einzelner Galectine die Hochregulation anderer Galectine zur Folge haben kann<sup>[69]</sup>, sollte ermittelt werden, ob es in der U343-Kokultur und bei der Behandlung mit LJPC-1010 zu einer Induktion von Gal-1, einem bei Krebserkrankungen oft verstärkt exprimierten Galectin<sup>[53]</sup>, kommt. Dafür wurden 697-Zellen sowohl in Monokulturen als auch in Kokulturen kultiviert und nach MACS-Isolierung der Zellen wurden sowohl die 697-Zellen aus der Monokultur als auch die 697-Zellen aus der Kokultur mit LJPC-1010 behandelt. Anschließend wurde die Gal-1 Expression mittels qPCR analysiert.



**Abb. 15: 697-Zellen zeigen sowohl in U343-Kokultur als auch bei Galectin-3 Inhibition und Mer-Knockdown eine erhöhte Galectin-1 Expression** | qPCR-Analysen der Gal-1 Expressionslevel in 697-Zellen. **(A)** 697-Zellen wurden in Monokultur oder nach Kokultivierung mit U343-Zellen mit DEPC-Wasser (-), 20 µg/ml oder 50 µg/ml LJPC-1010 (+) behandelt. Die Zellen in Monokultur wurden nach 48 h analysiert. Die kokultivierten Zellen wurden nach 48 h mittels magnetischer Zellseparation durch Markierung mit CD45 Microbeads isoliert. Nach der Separation und nach weiteren 72 h wurden die Gal-1 Expressionslevel analysiert. Als Kalibrator dienten unbehandelte U343-Zellen. **(B)** 697-Zellen mit shRNA-vermitteltem Knockdown von Mer (697shMer) und mit Kontrollvektor transfektierte 697-Zellen (697shGFP) wurden für 48 h in Monokultur oder in U343-Kokultur kultiviert. Als Kalibrator dienten in Monokultur kultivierte 697shGFP-Zellen. RQ = relative Quantifikation.

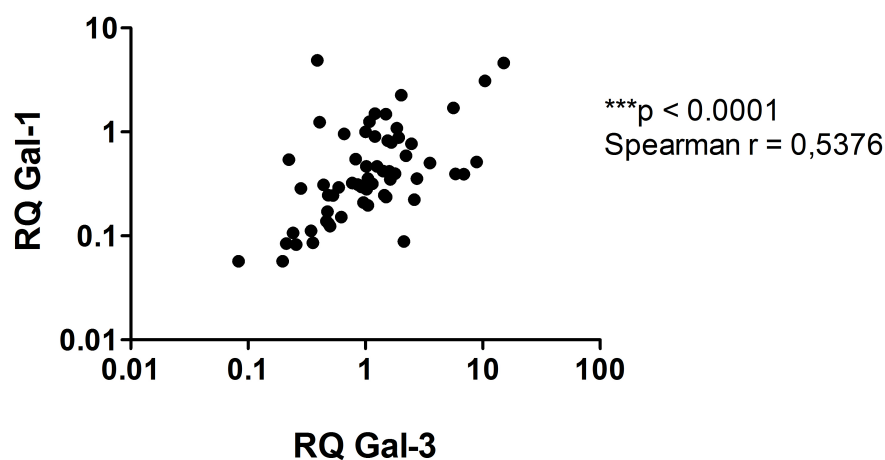
Dabei zeigte sich in den Monokulturen eine konzentrationsabhängige Induktion von Gal-1 unter der Behandlung mit LJPC-1010 (Abb. 15A). Bei der Behandlung mit 20 µg/ml LJPC-1010 war die Gal-1 Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um mehr als die Hälfte erhöht, bei der Behandlung mit 50 µg/ml LJPC-1010 mehr als verdoppelt. Eine noch stärkere Induktion war nach der Kokultivierung mit U343-Zellen zu erkennen. Hier waren die Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollen viermal so hoch. Auch 72 h nach der Isolation aus der Kokultur waren die Gal-1 Expressionslevel noch gleichermaßen erhöht. Die stärkste Gal-1 Expression zeigte sich bei Zellen, die zunächst mit U343-Zellen kultiviert und nach der Trennung mit LJPC-1010 behandelt wurden.

Daran anknüpfend sollte geprüft werden, ob neben der Inhibition von Gal-3 auch die Inhibition von Mer die Expression von Gal-1 beeinflusst. Dafür wurde in mono- und in zuvor mit U343-Zellen kokultivierten 697shMer- und 697shGFP-Zellen die Gal-1 Expression analysiert. Beim Vergleich der Expressionslevel zeigte sich in der Monokultur eine mehr als dreifach höhere Gal-1 Expression bei den 697shMer-Zellen als bei den 697shGFP-Kontrollen (Abb. 15B). In der Kokultur war das Expressionslevel der Mer-Knockdown-Zellen fast doppelt so hoch wie das der Kontrollen.

Insgesamt zeigte sich, dass die Expressions-Induktion von Galectinen im verwendeten ALL-ZNS-Modell nicht auf Gal-3 beschränkt ist und ein Mer-Knockdown oder eine Behandlung mit LJPC-1010 zu einer Induktion von Gal-1 führt, die möglicherweise kompensatorisch sein könnte.

Um weitergehend auch eine mögliche Assoziation der Galectine *in vivo* zu untersuchen, wurde in der bereits beschriebenen Kohorte von Patient\*innen mit  $t(1;19)^+$  ALL<sup>[40]</sup> die Expression von Gal-3 und Gal-1 in diagnostischen Knochenmarkproben des Erstdiagnosezeitpunkts analysiert und korreliert.

A



**Abb. 16:** Bei Patient\*innen mit  $t(1;19)^+$  ALL korrelieren die Expressionslevel von Galectin-3 und Galectin-1 | qPCR-Analyse der Gal-1 und Gal-3 Expressionslevel in Knochenmarkproben von 60 an  $t(1;19)^+$  ALL erkrankten Kindern und Jugendlichen zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung. RQ = relative Quantifikation.

Die Analyse ergab eine statistisch signifikante positive Korrelation der Expressionslevel von Gal-3 und Gal-1 bei Patient\*innen mit  $t(1;19)^+$  B-Vorläufer-ALL (Abb. 16).

Die nachfolgende Untersuchung klinischer Patientencharakteristika in der beschriebenen Gruppe ergab keine Korrelation mit der Gal-1 Expression (7, Tab. 17).

## 4 Diskussion

Die ALL ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter<sup>[1]</sup> und obwohl sich die Prognose in den letzten 40 Jahren deutlich verbessert hat<sup>[2, 4]</sup>, machen ALL Rezidive eine der häufigsten durch Krebs herbeigeführten Todesursachen bei Kinder und Jugendlichen aus<sup>[10]</sup>. Während bei der ALL Erstdiagnose nur bei 3 % der Erkrankten ein ZNS-Befall festgestellt wird<sup>[15, 22]</sup>, ist bei einem Drittel der ALL Rezidive das ZNS nachweislich von leukämischem Befall betroffen<sup>[15, 16]</sup>. Um die ZNS-ALL bei gleichzeitiger Verringerung der starken Therapietoxizität<sup>[24, 28-32]</sup> gezielt behandeln zu können, sind weitere Erkenntnisse über die Pathomechanismen der Erkrankung notwendig<sup>[42]</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Gal-3 als Überlebensfaktor leukämischer Zellen im ZNS untersucht.

### 4.1 Galectin-3 als Induktor eines Zellzyklusarrests von Leukämiezellen in der ZNS-Mikroumgebung

Es konnte beobachtet werden, dass U343-konditioniertes Medium einen Zellzyklusarrest von t(1;19)<sup>+</sup> 697-Zellen auslöst (3.1, Abb. 4). Dies weist auf einen zellzyklusinhibierenden Effekt durch im ZNS-Modell sezernierte Faktoren auf die verwendeten Leukämiezellen hin. Im Einklang dazu stehen weitere Experimente der Arbeitsgruppe, bei denen durch ein Transwell-System von U343-Zellen getrennte 697- und REH-Zellen in einen Zellzyklusarrest übergingen (Christian Pfeiffer; unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es in der U343/697-Kokultur zu einer signifikanten Erhöhung von Gal-3 im Überstand gegenüber den Monokulturen kommt<sup>[40]</sup>. Hieraus ergab sich ein erster Hinweis auf die Rolle von Gal-3 als einer der sezernierten zellzyklusinhibierenden Faktoren in der U343/697-Kokultur.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich der Zellzyklusarrest von 697-Zellen in U343-Kokultur durch zusätzliches rekombinantes Gal-3 verstärkt (3.1, Abb. 6), was die Hypothese der Zellzyklusarrest-Induktion durch Gal-3 in Leukämiezellen im ZNS-Modell stützt. Neben der Zellzyklusinhibition zeigte sich hier allerdings auch eine antiapoptotische Wirkung des Galectins (3.2, Abb. 6B). Dies erschwert es, Gal-3 mechanistisch als entscheidenden Induktor des Zellzyklusarrests in 697-Zellen zu bestätigen, da eine Gal-3 Inhibition mit LJPC-1010 in wachstumsarrestierten 697-Zellen nicht (nur) den Arrest der Zellen unterbricht, sondern auch zum Zelltod führt (3.2, Abb. 8). Diese antiapoptotische Wirkung von Gal-3 wird in 4.2. besprochen.

Des Weiteren zeigte sich, dass sich ein Zellzyklusarrest nur einstellt, wenn t(1;19)<sup>+</sup> 697-Zellen nicht solitär (3.2, Abb. 5), sondern mit U343-Zellen (3.2, Abb. 6) kokultiviert werden. Dies weist darauf



hin, dass hinzugefügtes rekombinantes Gal-3 alleine keinen Arrest in den untersuchten Zellen induzieren kann und deutet möglicherweise auf die Relevanz der ZNS-Mikroumgebung bei der Zellzyklusregulation durch Gal-3 hin. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es in der Arrest-verursachenden U343-Kokultur auch zu einer Induktion von Gal-1 in 697-Zellen kommt (3.6, Abb. 15). Da neben Gal-3 in der Literatur auch für Gal-1<sup>[105]</sup> und Gal-12<sup>[106]</sup> eine zellzyklusregulierende Wirkung beschrieben ist, ist es denkbar, dass erst die durch die U343-Kokultur induzierte stärkere Expression von Gal-1 oder anderer Galectine zum Arrest der Leukämiezellen führt. Inwieweit die Induktion eines Zellzyklusarrests leukämischer Zellen durch Gal-3 von weiteren Galectinen oder auch anderen zusätzlichen in der Mikroumgebung vorhandenen Faktoren abhängig ist, müsste weiterführend untersucht werden.

Neben der Notwendigkeit weiterer Faktoren der Mikroumgebung zur Induktion eines Zellzyklusarrests ist es auch möglich, dass die Mikroumgebung die Aufnahme von Gal-3 in die 697-Zellen ermöglicht. Dafür spricht, dass eine zellzyklusregulierende Wirkung für intrazelluläres (aufgenommenes oder induziertes) Gal-3 beschrieben ist<sup>[52, 56, 57]</sup>, wobei die Mechanismen der Aufnahme in ALL-Zellen noch nicht geklärt sind<sup>[107]</sup>. Möglicherweise wird Gal-3, wie auch von Fei *et al.*<sup>[107]</sup> für B-Vorläufer-ALL-Zellen beschrieben, in Exosomen durch eine so gebildete „Synapse“<sup>[108, 109]</sup> an die ALL-Zellen übermittelt, sodass als weitere Faktoren von den genutzten ZNS-Zellen gebildete Membranbestandteile für die Übermittlung von Gal-3 an die ALL-Zellen notwendig sein könnten.

Noch wahrscheinlicher erscheint allerdings, dass Gal-3 durch die Zellen der Mikroumgebung in den ALL-Zellen induziert wird. Dafür gibt es Hinweise von Untersuchungen anderer Leukämieentitäten. Yamamoto-Sugitani *et al.*<sup>[61]</sup> haben an einem *in vitro*-Modell der CML gezeigt, dass es bei Kontakt zu Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung zu einer Steigerung der Gal-3 Expressionslevel in den leukämischen Zellen kommt. Dies beobachteten Fei *et al.*<sup>[68]</sup> auch für die t(9;22)<sup>+</sup> B-Vorläufer-ALL. In einer weiteren Arbeit zeigten sie, dass Stromazellen der Knochenmark-Mikroumgebung Gal-3 sekretieren und dadurch eine Autoinduktion von Gal-3 in den t(9;22)<sup>+</sup> B-Vorläufer-ALL-Zellen anregen<sup>[107]</sup>. Dieser Mechanismus könnte auch auf das untersuchte U343/697-Modell zutreffen, in dem neben einer mittels ELISA bestimmten Sekretion von Gal-3 im Überstand der Kokultur<sup>[40]</sup> auch eine mittels intrazellulärem Staining gezeigte Steigerung von Gal-3 in 697-Zellen beobachtet werden konnte (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Ein wichtiger nächster Schritt wäre nun die weitere Untersuchung der Regulation von Gal-3 auf mRNA- und Proteinebene in den untersuchten 697-Zellen in der wachstumsarrestinduzierenden U343-Kokultur, welche sich bisher nicht umsetzen ließ.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung einer Zellzyklusinhibition durch Gal-3 finden sich in der Literatur Hinweise auf verschiedene zellzyklusinhibierende Signalwege, in die Gal-3 involviert ist (vgl. auch 1.2, Abb. 2). Aus Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen ist beispielsweise be-

kennt, dass diese die Proliferation von T-Zellen Gal-3-vermittelt hemmen<sup>[110-112]</sup>. An Brustkrebszellen wurde die Zellzyklusinhibition durch Gal-3 mechanistisch untersucht und gezeigt, dass bei dem Gal-3 vermittelten Zellzyklusarrest in der G1-Phase eine Herabregulation der Cycline E und A und eine Hochregulation deren Inhibitoren p27 und p21 sowie des Cyclin D involviert sind<sup>[113]</sup>. Später wurde gezeigt, dass Gal-3 für die Aktivierung von Cyclin D an das zellzyklusregulierende Protein  $\beta$ -Catenin bindet<sup>[114]</sup>. Auch für ALL-Zelllinien wurde im Rahmen der Gal-3 vermittelten Arzneimittelresistenz eine durch erhöhte Gal-3 Expression ausgelöste und durch  $\beta$ -Catenin vermittelte Aktivierung der Cyclin D-Transkription beschrieben: Hu *et al.*<sup>[115]</sup> untersuchten an *in vitro*-Modellen der Knochenmarknische mehrere Zelllinien, darunter zwei B-Vorläufer-ALL-Zelllinien und eine T-ALL-Zelllinie. Sie ermittelten folgendes Modell: Der Kontakt leukämischer Zellen zu Zellen der Mikroumgebung führt zu einer Überexpression von Gal-3 in den Leukämiezellen. Die Gal-3 Überexpression führt zu einer Hochregulierung von PI3K/Akt und GSK-3 $\beta$ , was wiederum den Abbau von  $\beta$ -Catenin vermindert. Das so vermehrt vorliegende  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern, wo es die Transkription von Zielgenen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, Cyclin D, Survivin und c-myc aktiviert. So könne erklärt werden, wie es durch den Kontakt von Leukämiezellen zur Knochenmark-Mikroumgebung zu einer Erhöhung der Gal-3 Expression und dadurch bedingt zu einer Arzneimittelresistenz kommen kann. Ob die beobachtete Zellzyklusinhibition durch Gal-3 auch bei t(1;19)<sup>+</sup> ALL-Zellen in der ZNS-Mikroumgebung durch einer Induktion von  $\beta$ -Catenin und Cyclin D erklärbar ist, könnte weiterführend untersucht werden.

Zusammenfassend ist eine zellzyklusregulierende Wirkung von Gal-3 beschrieben, welche im Rahmen dieser Arbeit auch für t(1;19)<sup>+</sup> 697-Zellen in der mittels U343/697-Kokultur modellierten ZNS-Nische beobachtet wurde. Gleichzeitig sind weitere Untersuchungen zu der Regulation der Gal-3 Expression notwendig. Dabei könnte die Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärem Gal-3 sowie das Einbeziehen weitere Galectine und durch Gal-3 beeinflussbarer arrestinduzierender Signalwege erwogen werden. Diese weiteren Untersuchungen scheinen vor allem deswegen relevant, weil ein leukämischer Zellzyklusarrest das Verbleiben von MRD und die Entstehung von ZNS-Rezidiven zur Folge haben kann<sup>[12-14]</sup>.

## 4.2 Galectin-3 als Apoptose-Inhibitor

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Gal-3 Inhibition mit LJPC-1010 *in vitro* zum Zelltod unterschiedlicher B-Vorläufer-ALL-Zellen führt (3.2, Abb. 7). Daneben führte die Behandlung von 697-Zellen mit Gal-3 im U343-Modell zu einer Verringerung toter Zellen (3.1, Abb. 6). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Gal-3 die Apoptose von B-Vorläufer-ALL-Zellen hemmt.

Ein weiterer Hinweis auf einen antiapoptotischen Effekt zeigte sich bei dem Versuch, Gal-3 in 697-Zellen durch Transfektion herunter zu regulieren. Während die Herabregulation von Mer problemlos durchgeführt werden konnte, waren die Gal-3-Knockdown-Zellen in mehreren Versuchen nicht überlebensfähig.

Passend dazu finden sich in der Literatur unterschiedliche antiapoptotisch wirkende Signalwege, in denen Gal-3 eingebunden ist. So ist bspw. bei der durch den Tumorsuppressor p53 induzierten Apoptose eine Unterdrückung von Gal-3 involviert<sup>[116]</sup>. Daneben hat Gal-3 strukturelle Gemeinsamkeiten mit den Mitgliedern der Bcl-2 Familie und besitzt die gleiche Aminosäuresequenz (NWGR), welche die Apoptosehemmung durch Bcl-2 vermittelt<sup>[117]</sup>. Des Weiteren kann das Galectin durch Bindung an Synexin zu Mitochondrien transportiert werden, wo es die Veränderung des Membranpotentials und damit die apoptoseinduzierende Freisetzung des Cytochrom c verhindern kann<sup>[118, 119]</sup> (vgl. Abb. 2).

Ob die bei Gal-3 Inhibition beobachtete Zelltodinduktion bei B-Vorläufer-ALL-Zellen mechanistisch durch die Hemmung dieser antiapoptotischer Signalwege erklärbar ist, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

#### 4.1 Die Galectin-3/Mer-Achse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in t(1;19)<sup>+</sup> 697-Zellen unter der Behandlung mit dem Gal-3 Inhibitor LJPC-1010 zu einer Erhöhung der Mer-Expression auf mRNA- und Proteinebene kommt (3.3, Abb. 10). Dies könnte einen ersten Hinweis auf einen Feedback-Mechanismus geben, bei dem Mer in 697-Zellen bei Inhibition von Gal-3, möglicherweise kompensatorisch zur Vermittlung von Überlebenssignalen, erhöht wird. Dazu passend zeigte sich eine signifikante Zunahme toter B-Vorläufer-ALL-Zellen bei kombinierter Gal-3 und Mer-Inhibition durch die kleinenmolekularen Inhibitoren LJPC-1010 und UNC-569 (3.2, Abb. 12) oder durch genetische Herabregulierung von Mer mittels shorthairpin Transfektion (3.2, Abb. 11), was sich auch durch den propagierten Gal-3/Mer-Feedback Mechanismus erklären ließe: Kann Mer bei Gal-3 Inhibition nicht kompensatorisch induziert werden, erhöht sich die Zelltodrate weiter.

Passend zu einer Gal-3/Mer-Achse zeigten vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe, dass die Induktion von sezerniertem Gal-3 in der U343-Kokultur von der Mer-Expression der B-Zell-Vorläufer-ALL-Zellen abhängig ist (Christian Pfeiffer; unveröffentlichte Daten). Hier war die mittels ELISA bestimmte Gal-3 Konzentration im Überstand der U343-Kokultur bei 697-Zellen mit spezifischem Mer-Knockdown (697shMer) geringer als bei Kontrollzellen ohne Knockdown. Auch wenn die genaue gegenseitige Regulierung durch die beschriebenen Daten nicht geklärt ist, weisen diese auf Wechselwirkungen zwischen Gal-3 und Mer hin.

In der Literatur finden sich zu der hier untersuchten Gal-3/Mer-Achse neben den beschriebenen noch keinerlei Daten. Als Mer-Ligand entdeckt wurde Gal-3 erst 2012 als letzter der bekannten Liganden: Caberoy *et al.*<sup>[120]</sup> zeigten Gal-3 als Mer-spezifisches Apoptosesignal für Makrophagen und retinale Pigmentepithelzellen. Erst Krause *et al.*<sup>[40]</sup> stellten einen Zusammenhang zwischen Mer-exprimierenden malignen Zellen und Gal-3 im Rahmen der ALL im Kindesalter her: Im U343-Modell, in dem Mer-exprimierende ALL-Zelllinien in einen Zellzyklusarrest übergingen, war Gal-3 als einziger Mer-Ligand in den verwendeten ZNS-Zellen verstärkt exprimiert und im Überstand der ZNS-Kokultur nachweisbar.

Die Beobachtungen dieser Arbeit deuten nun auf eine regulatorische Gal-3/Mer-Achse bei  $t(1;19)^+$  ALL-Zellen hin. Die genauen Regulationsmechanismen müsste allerdings weiterführend, auch in anderen Zelllinien, untersucht werden.

## 4.2 Galectin-3 als therapeutischer Angriffspunkt

Erste Hinweise auf die Wirksamkeit einer Gal-3 Inhibition mit LJPC-1010 ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit aus *in vitro* Untersuchungen. Dabei konnte für die Zelllinien 697, MHH-Call3, REH, UOCB6, SUP-B15 und RS4;11 gezeigt werden, dass LJPC-1010 die Viabilität dieser B-Vorläufer-ALL-Zellen reduziert (3.2, Abb. 7). Besonders stark war die Viabilitätsreduktion bei der Behandlung von SUP-B15-Zellen mit der Philadelphia-Translokation  $t(9;22)$  und RS4;11-Zellen mit der Translokation  $t(4;11)$  (3.2, Abb. 7), welche beide mit einer ZNS-Beteiligung und einer schlechten Prognose assoziiert sind<sup>[15]</sup>. Hierzu passen Beobachtungen von Yamamoto-Sugitani *et al.*<sup>[61]</sup>, die  $t(9;22)^+$  Zellen im Rahmen der CML untersuchten. *In vitro* zeigten sie eine durch die Knochenmark-Nische induzierte Steigerung der Gal-3 Expression bei Zellen mit dieser Translokation, die außerdem zu einer Arzneimittelresistenz führte. Auch die Untersuchungen von Fei *et al.*<sup>[68]</sup> an der B-Vorläufer-ALL wurden an Zellen mit der Translokation  $t(9;22)$  durchgeführt. Sie beobachteten Gal-3 in und auf Leukämiezellen aus Patientenproben, sowie erhöhte Gal-3 Level im Knochenmarkplasma von Patient\*innen im Vergleich zu Proben von Nichterkrankten. *In vitro* wurde außerdem bei Zellen mit erhöhter Gal-3 Expression eine Chemoresistenz gegenüber Nilotinib und Vincristin gezeigt. Aufgrund dieser Daten sowie der Beobachtung der verstärkten Zelltodinduktion durch LJPC-1010 bei Zellen mit der Translokation  $t(9;22)$  und deren Assoziation mit einer ZNS-Beteiligung<sup>[15]</sup> könnte die Wirksamkeit von LJPC-1010 nachfolgend an Xenografts mit dieser Translokation untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde *in vitro* außerdem gezeigt, dass bei der Behandlung mit LJPC-1010 der Zelltod wachstumsarretierter 697-Zellen induziert wird (3.2, Abb. 8). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass auch wachstumsarretierte  $t(1;19)^+$  ALL-Zellen durch eine Gal-3 Inhibition erfasst werden können. Dies ist von Relevanz, da eine besondere Schwierigkeit bei der Eliminierung von Krebszellen

durch Chemotherapeutika die Erfassung sich nur langsam teilender Zellen ist. Beschrieben sind eine direkte Eliminierung wachstumsarretierter residueller Zellen<sup>[121]</sup> oder die Unterbrechung des Arrests<sup>[122]</sup>. Die Gal-3 Inhibition könnte dabei durch die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete antiapoptotische (4.2) und zellzyklusarrestvermittelnde (4.1) Funktion sowohl zelltodinduzierend, als auch arrestunterbrechend wirken.

Daneben zeigte sich in dieser Arbeit, dass 697-Zellen auch in der U343-Kokultur sensitiv auf eine LJPC-1010 Therapie sind (3.2, Abb. 9). Dies könnte einen ersten Hinweis darauf geben, dass auch  $t(1;19)^+$  ALL-Zellen in der schützenden ZNS-Nische erfasst werden können.

Nachfolgend wurde LJPC-1010 *in vivo* untersucht. Bei oraler Behandlung mit dem Inhibitor in  $t(1;19)^+$  ALL-Xenografts wurden dabei eine signifikant geringere Last humaner Leukämiezellen im peripheren Blut und ein statistisch signifikantes leicht verlängertes Überleben der Tiere beobachtet (3.4, Abb. 13). Dies könnte bedeuten, dass eine Gal-3 Inhibition den Krankheitsverlauf bei  $t(1;19)^+$  ALL verzögern und das Überleben verlängern kann. Während bei Mer-Inhibition mit UNC-569 am Xenograft-Mausmodell bei Untersuchungen von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> neben verlängerten Überlebenszeiten auch eine deutliche Verringerung des ZNS-Befalls erkennbar war, zeigte sich in dieser Arbeit bei der Verwendung von LJPC-1010 der Befall des ZNS jedoch nicht gemindert (3.4, Abb. 14).

Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Eine naheliegende Erklärung ist eine nicht ausreichend hohe Gal-3 Expression der verwendeten Leukämiezellen. Da allen Versuchstieren Leukämiezellen der gleichen Patientin injiziert wurden, hätten bei der gezielten Auswahl leukämischer Zellen einer Patientin mit einer Gal-3 Expression über dem Median der Kohorte möglicherweise noch stärkere Effekte der Therapie erzielt werden können. Daneben hätte möglicherweise auch die Behandlung der Kontrollgruppe, die aufgrund der Lösung von LJPC-1010 in Wasser nicht behandelt wurden und so nicht dem täglichen Eingriff der oralen Gavage als Stressfaktor ausgesetzt waren, die Ergebnisse verbessert. Ein möglicher Grund für den nicht geminderten ZNS-Befall ist daneben die Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke. Während der Mer-Inhibitor UNC-569 als lipophiles kleines (396 Da) Molekül die bei akuten Leukämien durchlässigere<sup>[123]</sup> Blut-Hirn-Schranke vermutlich überwinden kann, ist dies für das hydrophile 125 kDa große Polysaccharid LJPC-1010 unwahrscheinlich<sup>[124]</sup>. Eine alternative Applikationsform, intravenös oder intrathekal könnte möglicherweise besser wirken.

Zudem ist es denkbar, dass es bei Gal-3 Inhibition zu einer Veränderung der Mer-Expression oder Aktivierung anderer Überlebenssignalwege kommt. Dafür spricht die in dieser Arbeit gezeigte Expressionssteigerung von Mer und phosphoryliertem Akt bei der LJPC-1010 Behandlung von 697-Zellen *in vitro* (3.3, Abb. 10). Wie bei Krause *et al.*<sup>[40]</sup> gezeigt, kann dies wiederum einen verstärkten ZNS-Befall verursachen. Da in dieser Arbeit außerdem an 697-Zellen *in vitro* eine im Vergleich zur Monotherapie verstärkte Lebendzellzahl-Reduktion bei der kombinierten Mer- und Gal-3 Inhibition durch LJPC-1010+UNC-569 gezeigt werden konnte (3.3, Abb. 12), wäre in einem nächsten Schritt *in vivo* zu prüfen, ob Überleben und ZNS-Befall durch kombinierte Gal-3 und Mer-Inhibition verbessert wer-

den können. Dabei müsste der verwendete Inhibitor LJPC-1010, nachdem dessen Produktion durch den Hersteller eingestellt wurde, ersetzt werden. Nach erneuten *in vitro*-Untersuchungen an ALL-Zelllinien, könnte bspw. das Citruspektin GCS-100 verwendet werden, welches zudem bereits in anderen Leukämieentitäten, auch in Patient\*innen<sup>[97]</sup>, untersucht wurde<sup>[95-99]</sup> (s.u.) und intravenös applizierbar ist<sup>[97]</sup>.

Eine andere mögliche Erklärung für die Beobachtung des unveränderten ZNS-Befalls der Versuchstiere ist eine mit der Inhibition von Gal-3 verbundene Auswirkung auf weitere Mitglieder der Galectin-Familie. Obwohl unterschiedliche Galectine unterschiedliche Bindungspräferenzen besitzen<sup>[125]</sup>, sind besonders bei Inhibition eines Galectins<sup>[69]</sup> gleiche Funktionen der einzelnen Mitglieder beschrieben<sup>[52]</sup>. Dies steht in Übereinstimmung zu Untersuchungen in dieser Arbeit (3.6, Abb. 15) und bei Krause *et al.*<sup>[40]</sup>, bei denen am U343-Modell eine Induktion von sowohl Gal-3 als auch Gal-1 gezeigt wurden. In dieser Arbeit zeigte sich außerdem, dass es bei der Inhibition von Gal-3 durch LJPC-1010 zu einer Erhöhung der Gal-1 Expression kommt (3.6, Abb. 15). Diese Beobachtungen deuten auf eine Auswirkung von LJPC-1010 auch auf andere Galectine hin, die folglich bei weiteren Untersuchungen zusätzlich inhibiert werden könnten. Daneben zeigte die Untersuchung von Proben einer t(1;19)<sup>+</sup>-ALL-Kohorte in dieser Arbeit korrelierende mRNA Expressionslevel der beiden Galectine (3.6, Abb. 16), was möglicherweise zusätzlich auf eine ähnliche Wirkweise in der untersuchten Entität hinweist. In der Literatur sind die Interaktionen unterschiedlicher intrazellulärer Galectine noch unbekannt<sup>[52]</sup> und Untersuchungen beschränken sich in der Regel auf einzelne Galectine<sup>[69]</sup>. Demgegenüber könnte in zukünftigen Arbeiten das Zusammenwirken der verschiedenen Galectine berücksichtigt werden.

Problematisch könnte bei der Inhibition von Galectinen jedoch deren ubiquitäre Expression<sup>[56]</sup> sein. Im ZNS sind Galectine an der Myelinisierung von Nervenfasern, der Proliferation neuronaler Stammzellen und dem apikalen vesikulären Transport in Neuronen beteiligt und erhalten so die Homöostase im ZNS aufrecht<sup>[47]</sup>. Zwar wurden andere Gal-3 Inhibitoren schon weitergehend präklinisch untersucht oder befinden sich teilweise schon in der klinischen Testung; der Gal-3 Inhibitor GCS-100 wurde erfolgreich in präklinischen Modellen des Multiplen Myeloms<sup>[95, 96]</sup>, des Lymphoms<sup>[97]</sup>, der AML<sup>[98]</sup> und des DLBCL<sup>[99]</sup> eingesetzt und die Gal-3 Inhibitoren GM-CT-01 und GR-MD-02 werden derzeit für solide Tumore in klinischen Phase-I- und Phase-II- Studien untersucht<sup>[53]</sup>. Im Rahmen der ZNS-ALL wurde allerdings noch keiner der Wirkstoffe untersucht und mögliche neuronale Nebenwirkungen sollten bei der weiteren Testung beachtet werden.

### 4.3 Galectin-3 als prognostischer Parameter

Bei der Analyse von Knochenmarkproben des Erstdiagnosezeitpunktes von Patient\*innen mit  $t(1;19)^+$  ALL zeigte sich in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen Gal-3 oder Gal-1 Expressionsleveln und diagnostischen oder prognostischen Parametern (3.5, Tab. 16 und 7, Tab. 17). Allerdings lassen die durchgeführten Messungen keine Aussagen über etwaige Veränderungen im jeweiligen Mikromilieu zu. Da Galectine aber vermehrt in der Knochenmark-<sup>[69, 70]</sup> bzw. ZNS-Nische <sup>[47]</sup> exprimiert werden, könnten sich Alterationen der Gal-3 Expression in der Mikroumgebung auf das biologische Verhalten der Leukämiezellen auswirken. Eine Alternative zur Analyse der Expression leukämischer Zellen wäre die Bestimmung von sezerniertem Gal-3 in der Mikroumgebung des Blutes, des Knochenmarks oder des ZNS mittels ELISA. Dies wurde bei anderen Entitäten bereits durchgeführt, wobei sich im Serum von Patient\*innen mit Blasenkrebs<sup>[126]</sup> oder metastasiertem Melanom<sup>[127]</sup> eine Erhöhung von Gal-3 im Vergleich zu gesunden Kontrollproband\*innen zeigte. Im Knochenmarkplasma, allerdings nicht im Blutplasma, wurde bei Patient\*innen mit B-Vorläufer-ALL eine erhöhte Gal-3 Konzentration festgestellt<sup>[68]</sup>. Um die Konzentration von Gal-3 in der ZNS-Mikroumgebung beurteilen zu können, könnte eine ELISA-Untersuchung des Liquors erfolgen. Diese wurde für neurologische Erkrankungen bereits durchgeführt, wobei sich beispielsweise bei Patient\*innen mit amyotropher Lateralsklerose<sup>[128]</sup> und bei Neugeborenen mit Asphyxie<sup>[129]</sup> erhöhte Gal-3 Werte im Liquor nachweisen ließen.

Daneben ist es relevant, dass die Proben vom Diagnosezeitpunkt stammen, sich die Expression aber möglicherweise im Verlauf der Erkrankung oder unter der Therapie ändert. Deswegen wäre es interessant, auch Proben im Verlauf zu untersuchen.

Außerdem wurde die Expression von Gal-3 für diese Arbeit auf mRNA-Ebene und unabhängig von der Lokalisation als Protein untersucht. Zu bedenken ist dabei, dass Gal-3 zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln kann, wodurch sich seine Funktion ändert. So kann Gal-3 im Zellkern proapoptotisch wirken, während es im Zytoplasma antiapoptotisch wirken kann<sup>[57]</sup>. Es ist also möglich, dass bei der Untersuchung von Gal-3 auf Proteinebene im Zellkern erniedrigte Gal-3 Level nachgewiesen werden, während sie im Zytoplasma erhöht sind<sup>[130]</sup>. Weiterführend könnte deswegen das Verhältnis von Gal-3 in Zellkernextrakte gegenüber dem der Plasmafraktion betrachtet werden.

Insgesamt scheinen die Gal-3 Expressionslevel in Knochenmarkproben des Erstdiagnosezeitpunktes von  $t(1;19)^+$  ALL Patient\*innen nicht als prognostischer oder diagnostischer Parameter geeignet zu sein. Alternativen Formen der Galectin-Messung, im Mikromilieu, zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung oder in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb der Zelle, könnte jedoch weiter nachgegangen werden.

#### 4.4 Limitationen der Modelle

In der vorliegenden Arbeit wurde Gal-3 in Anknüpfung an Voruntersuchungen von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> in der t(1;19)<sup>+</sup> ALL im Kindesalter untersucht. Um die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Funktionen von Gal-3 besser zu verstehen, müsste das Galectin allerdings auch in weiteren leukämischen Zelllinien untersucht werden. Durch größere Versuchszahlen könnte außerdem die statistische Signifikanz der einzelnen Ergebnisse erhöht werden.

Weiterhin ist zu bedenken, dass Gal-3 in der vorliegenden Arbeit durch den pharmakokinetisch nicht weitergehend untersuchten Inhibitor LJPC-1010 inhibiert wurde. Um die Effekte des Inhibitors mechanistisch als die vom Hersteller postulierte Inhibition Gal-3 zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen folgen. Dabei könnte erwogen werden, die Versuche mit einem anderen, bereits etablierten Inhibitor wie GCS-100<sup>[95-99]</sup> zu wiederholen. Außerdem müsste Gal-3 in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang.

Generell ist zu berücksichtigen, dass *in vitro*- und auch *in vivo*-Modelle die Komplexität systemischer Erkrankungen nur bedingt abbilden können. Die für diese Arbeit verwendete *in vitro* U343-Kokultur wurde bereits von Krause *et al.*<sup>[40]</sup> überprüft, um auszuschließen, dass Wachstumsarrest und Chemoresistenz der untersuchten leukämischen Zellen an der Malignität der verwendeten Gliomzellen<sup>[84]</sup> lag. Dafür wurden die Versuche mit „gesunden“ ZNS-Zellen, aus neonatalen Ratten gewonnenen Astrozyten<sup>[131]</sup>, wiederholt, wobei sich die Befunde des U343-Modells bestätigten<sup>[40]</sup>. Trotzdem kann eine Kokultur die Komplexität der Mikroumgebung mit unterschiedlichen Zelltypen und Wachstumsformen nur bedingt nachahmen.

In der Literatur sind zur Untersuchung der Interaktion leukämischer Zellen mit der Knochenmarkmikroumgebung verschiedenen Modellen beschrieben, für das ZNS allerdings nur wenige. Ein alternatives *in vitro*-Modell der ZNS-ALL wurden von Akers *et al.*<sup>[132]</sup> genutzt. Sie verwendeten Astrozyten, Plexus choroideus- und Meningealzellen zur Kokultivierung leukämischer Zellen, um so eine ZNS-vermittelte Chemoresistenz leukämischer Zellen zu zeigen.

Um zu untersuchen, ob Gal-3 neben der Vermittlung von Überlebenssignalen in der Nische auch an dem leukämischen Eintritt in das ZNS beteiligt ist, könnten außerdem *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn-<sup>[133, 134]</sup> oder Blut-Liquor-Schranke<sup>[135, 136]</sup> verwendet werden.

Für die Untersuchung der Gal-3 Inhibition mit LJPC-1010 *in vivo* wurde ein Xenograft-Modell mit NSG-Mäusen verwendet. Durch Injektion von Leukämiezellen der gleichen Patientin entwickelten alle Tiere eine genotypisch identische Leukämie, weshalb das Modell die Heterogenität innerhalb einer



Patientenpopulation nicht widerspiegelt. Eine Möglichkeit, präklinisch eine Phase-II-Studie mit Hilfe einer Sammlung von Material unterschiedlicher Patient\*innen nachzuahmen, wurde von Townsend *et al.*<sup>[137]</sup> vorgestellt und auch von Schewe *et al.*<sup>[138]</sup> bereits verwendet.

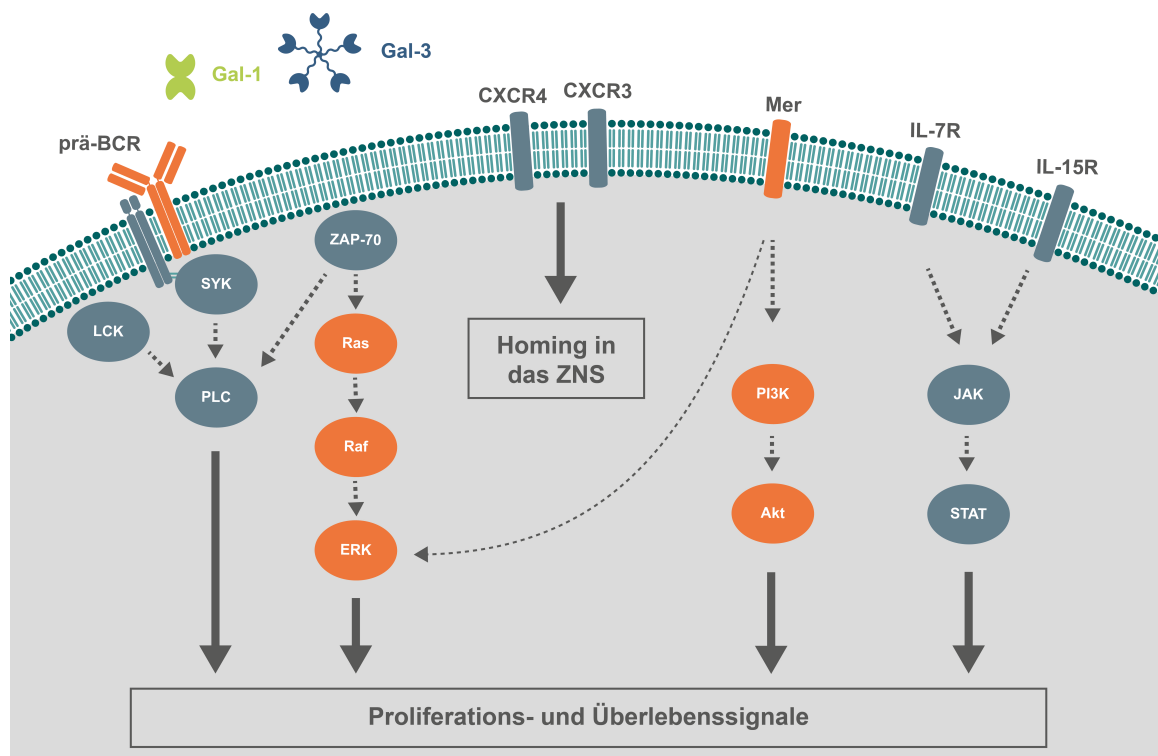
Für die weitere Untersuchung von Gal-3 *in vivo* wäre es außerdem interessant, mit immunkompetenteren NOD-scid-Mäusen zu arbeiten (vgl. auch 2.2.11), um auch eine tumorfördernde Beeinflussung des Immunsystems durch Gal-3 erfassen zu können. Neben der Gal-3 vermittelten Apoptoseinduktion in T-Zellen<sup>[139, 140]</sup> und der Verringerung deren Aktivität durch Bindung an den T-Zell-Rezeptor<sup>[141, 142]</sup>, was Gal-3 zum potentiellen Target einer Immunstimulation macht<sup>[97, 143]</sup>, kann Gal-3 NK-Zellen inhibieren<sup>[144]</sup>, die zu einer effizienten Lyse von Leukämiezellen führen<sup>[145]</sup>. Durch ein Modell mit NOD-scid-Mäusen, die im Gegensatz zu den verwendeten NSG-Mäusen NK-Zellen besitzen, könnte der Effekt einer Gal-3 Inhibition auf murine NK-Zellen auch für die t(1;19)<sup>+</sup> ALL untersucht werden.

Da die NK-Zell-Aktivierung, wie von Frishman-Levy *et al.*<sup>[44]</sup> gezeigt, die Aggressivität systemischer ALL reduziert, die ZNS-Infiltration jedoch verstärkt, sollte bei einer NK-Zell-stimulierenden Therapie jedoch auch eine ZNS-gerichtete Therapie einbezogen werden. Dies könnte durch eine kombinierte Gal-3 und Mer-Inhibition angestrebt werden, wobei die Mer-Inhibition zusätzlich die antitumorale Aktivität von T-<sup>[146]</sup> und von NK-Zellen<sup>[147]</sup> verstärken kann.

Insgesamt geben die gezeigten präklinischen Daten erste Hinweise auf eine Rolle von Gal-3 bei der t(1;19)<sup>+</sup> ZNS-ALL, die aber noch deutlich erweitert werden müssten, um vielleicht irgendwann klinisch genutzt werden zu können.

## 4.5 Ausblick

In einer aktuellen Publikation stellen Dr. Ameera Alsadeq und PD Dr. Denis Schewe die bekannten, für die ZNS-ALL relevanten Rezeptoren und Signalwege anschaulich zusammen<sup>[77]</sup>. Da die Ergebnisse dieser Arbeit andeuten, dass auch Gal-3 und möglicherweise Gal-1 Überlebenssignale leukämischer Zellen im ZNS vermitteln können, wurden sie in die Abbildung integriert (Abb. 17). Weiterführende Untersuchungen könnten die in vorherigen Teilen dieser Arbeit beschriebenen Fragen nach den durch Gal-3 beeinflussten Signalwegen, dem Zusammenspiel mit anderen Galectinen, der immunologischen Funktion von Gal-3, der Nutzung von Gal-3 als Target bei kombinierten Therapien und nach dem diagnostischen und prognostischen Nutzen der Messung von Gal-3 im Liquor aufgreifen. Die kombinierte Gal-3 und Mer bzw. Gal-3 und Gal-1 Inhibierung *in vivo* könnte dabei den nächsten Schritt darstellen.



**Abb. 17: Postuliertes Schema der Oberflächenrezeptoren und Signalwege bei der ZNS-ALL** | Übersicht nach Alsadeq und Schewe<sup>[77]</sup>, adaptiert und ergänzt um Gal-3, welches an die Tyrosinkinase Mer<sup>[120]</sup> binden und bei der ALL Einfluss auf den PI3K/Akt Signalweg nehmen kann<sup>[115]</sup> und um Gal-1, welches an den prä-BCR binden kann<sup>[148]</sup>. Sowohl Gal-1 als auch Gal-3 können das Proto-Onkogen Ras beeinflussen, wobei Gal-1 HRAS und ERK moduliert, während Gal-3 Einfluss auf KRAS und PI3K nimmt<sup>[50]</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darüber hinaus auf sich überschneidende Funktionen der beiden Galectine sowie auf eine Verknüpfung zwischen Gal-3 und Mer sowie Akt hin.

In der Abbildungen vorkommende Moleküle sind in der Bildunterschrift unterstrichen. Moleküle, die mit Gal-3 und/oder Gal-1 in Verbindung gebracht wurden, sind in der Abbildung in orange dargestellt.

## 5 Zusammenfassung

**Fragestellung:** Bei Untersuchungen der pädiatrischen B-Vorläufer-ALL wurde gezeigt, dass die Tyrosinkinase Mer im ZNS-Modell eine Quieszenz und Chemoresistenz von Leukämiezellen vermittelt, bei immundefizienten Mäusen einen ZNS-Befall verursacht und bei Kindern und Jugendlichen mit  $t(1;19)^+$  ALL mit der ZNS-Positivität korreliert. Als relevanter Mer-Ligand kommt Galectin-3 in Frage, dessen tumorfördernden Eigenschaften in unterschiedlichen Entitäten gezeigt wurde. Mit der vorliegenden Arbeit sollte der Rolle von Galectin-3 bei der ZNS-ALL nachgegangen werden.

**Material und Methoden:** Zur Imitierung der ZNS-Nische wurde ein Kokulturmodell mit 697- und U343-Zellen verwendet. *In vitro* wurden so die Interaktion zwischen Leukämie- und ZNS-Zellen sowie die Auswirkungen einer Veränderung von Galectin-3 oder Mer durch Verwendung der kleinenmolekularen Inhibitoren LJPC-1010 und UNC-569 oder durch genetische Herunterregulierung mittels stabilem lentiviralem Gentransfer von shRNA untersucht. Dabei wurden Zellwachstum und Zellüberleben durch Trypanblau Exklusion und Propidiumiodid-Zellzyklusanalyse ermittelt. Die Auswirkung auf die Expression relevanter Moleküle, Galectin-3, Galectin-1, Mer, und Akt wurden mittels qPCR oder Western Blot analysiert. Um mögliche Effekte einer Galectin-3 Inhibition *in vivo* zu zeigen, wurde ein murines Xenograft-Modell verwendet. Die Ausbreitung der Leukämie, die Überlebenszeit der Tiere und der ZNS-Befall wurden untersucht. Schließlich wurden mittels qPCR analysierte Galectin-3 und Galectin-1 Expressionslevel einer Kohorte von 60 bzw. 61 Patient\*innen mit  $t(1;19)^+$  ALL mit klinischen Parametern wie dem ZNS-Status, dem Therapieansprechen und weiteren prognostischen Faktoren korreliert.

**Ergebnisse:** Im *in vitro* ZNS-Modell zeigte sich, dass Galectin-3 den Wachstumsarrest von  $t(1;19)^+$  697-Zellen verstärkt und die Inhibition von Galectin-3 mit LJPC-1010 zu einer Apoptose von B-Vorläufer-ALL-Zellen führt. Weiterhin wurden eine von Galectin-3 abhängige Regulation von Mer und Akt sowie synergistische Effekte einer kombinierten Galectin-3- und Mer-Inhibition gezeigt. Es konnte außerdem eine von Galectin-3 und Mer abhängige Regulation von Galectin-1 beobachtet werden. Im Mausmodell zeigte sich, dass eine Inhibition von Galectin-3 mit LJPC-1010 nicht zu einem geringeren ZNS-Befall, jedoch zu einem verzögerten Engraftment und einem leicht verlängerten Überleben der Tiere führt. Die Analyse von Zellen der ALL-Patientenkohorte mit  $t(1;19)$  Translokation zeigte keine signifikante Korrelation von Galectin-3 oder Galectin-1 und klinischen Charakteristika, obgleich sich korrelierende Expressionslevel von Galectin-3 und Galectin-1 zeigten.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen legen eine überlebensfördernde Funktion von Galectin-3 für B-Vorläufer-ALL-Zellen in der ZNS-Mikroumgebung nahe. Diese scheint durch die Induktion eines Zellzyklusarrests und durch die Inhibition von Apoptose vermittelt werden zu können und beinhaltet möglicherweise weitere Galectine. Die *in vivo*-Untersuchungen geben weite-

re Hinweise auf eine potentielle therapeutische Anwendung einer Galectin-3 Inhibition. Diese bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen. Als diagnostischer Parameter kommt Galectin-3 in der untersuchten Form nicht in Frage.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Bartram CR, Schrauder A, Kohler R, Schrappe M: **Acute lymphoblastic leukemia in children: treatment planning via minimal residual disease assessment.** *Dtsch Arztebl Int* 2012, **109**(40):652-658.
2. Schrappe M, Nachman J, Hunger S, Schmiegelow K, Conter V, Masera G, Pieters R, Pui CH: **'Educational symposium on long-term results of large prospective clinical trials for childhood acute lymphoblastic leukemia (1985-2000)'. *Leukemia* 2010, **24**(2):253-254.**
3. Riehm H, Gadner H, Welte K: **[The west-berlin therapy study of acute lymphoblastic leukemia in childhood--report after 6 years (author's transl)]. *Klin Padiatr* 1977, **189**(8):89-102.**
4. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, Vora A, Baruchel A, Silverman LB, Schmiegelow K, Escherich G, Horibe K, Benoit YC, Izraeli S, Yeoh AE, Liang DC, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Mullighan CG: **Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration.** *J Clin Oncol* 2015, **33**(27):2938-2948.
5. Stanulla M, Schrappe M: **Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Semin Hematol* 2009, **46**(1):52-63.
6. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, Arico M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig WD, Haas OA, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Bradtke J, Parasole R, Beier R, van Dongen JJ, Biondi A, Schrappe M: **Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study.** *Blood* 2010, **115**(16):3206-3214.
7. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, Parasole R, Zimmermann M, Dworzak M, Buldini B, Reiter A, Basso G, Klingebiel T, Messina C, Ratei R, Cazzaniga G, Koehler R, Locatelli F, Schafer BW, Arico M, Welte K, van Dongen JJ, Gadner H, Biondi A, Conter V: **Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study.** *Blood* 2011, **118**(8):2077-2084.
8. Campana D, Pui CH: **Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2017, **129**(14):1913-1918.
9. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G: **[Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 1987, **199**(3):151-160.**
10. Locatelli F, Schrappe M, Bernardo ME, Rutella S: **How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2012, **120**(14):2807-2816.
11. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Zintl F, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Niethammer D, Welte K, Stanulla M, Odenwald E, Riehm H, Schrappe M: **Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000.** *Leukemia* 2010, **24**(2):265-284.
12. Aguirre-Ghiso JA: **Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(11):834-846.
13. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA: **Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field.** *Nat Rev Cancer* 2014, **14**(9):611-622.
14. Lutz C, Woll PS, Hall G, Castor A, Dreau H, Cazzaniga G, Zuna J, Jensen C, Clark SA, Biondi A, Mitchell C, Ferry H, Schuh A, Buckle V, Jacobsen SW, Enver T: **Quiescent leukaemic cells account for minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukaemia.** *Leukemia* 2013, **27**(5):1204-1207.

15. Pui CH, Howard SC: **Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia.** *Lancet Oncol* 2008, **9**(3):257-268.
16. Krishnan S, Wade R, Moorman AV, Mitchell C, Kinsey SE, Eden TO, Parker C, Vora A, Richards S, Saha V: **Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials, 1985-2001.** *Leukemia* 2010, **24**(2):450-459.
17. Gaynes JS, Jonart LM, Zamora EA, Naumann JA, Gossai NP, Gordon PM: **The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemo-resistance.** *Haematologica* 2017, **102**(4):e136-e139.
18. Laningham FH, Kun LE, Reddick WE, Ogg RJ, Morris EB, Pui CH: **Childhood central nervous system leukemia: historical perspectives, current therapy, and acute neurological sequelae.** *Neuroradiology* 2007, **49**(11):873-888.
19. Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R: **The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A).** *Cancer* 1970, **26**(2):404-409.
20. Price RA, Johnson WW: **The central nervous system in childhood leukemia. I. The arachnoid.** *Cancer* 1973, **31**(3):520-533.
21. Schrappe M: **AIEOP-BFM ALL 2009: Internales kooperatives Behandlungsprotokoll für Kinder und Jugendliche mit akuter lymphoblastischer Leukämie. Protokollversion: 1.3.** 2013.
22. Burger B, Zimmermann M, Mann G, Kuhl J, Loning L, Riehm H, Reiter A, Schrappe M: **Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture.** *J Clin Oncol* 2003, **21**(2):184-188.
23. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Howard SC, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Pui CH: **Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1.** *Leukemia* 2009, **23**(8):1406-1409.
24. Mody R, Li S, Dover DC, Sallan S, Leisenring W, Oeffinger KC, Yasui Y, Robison LL, Neglia JP: **Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study.** *Blood* 2008, **111**(12):5515-5523.
25. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV: **Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation.** *N Engl J Med* 2009, **360**(26):2730-2741.
26. Richards S, Pui CH, Gayon P, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Collaborative G: **Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatr Blood Cancer* 2013, **60**(2):185-195.
27. Vora A, Andreano A, Pui CH, Hunger SP, Schrappe M, Moericke A, Biondi A, Escherich G, Silverman LB, Goulden N, Taskinen M, Pieters R, Horibe K, Devidas M, Locatelli F, Valsecchi MG: **Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy.** *J Clin Oncol* 2016, **34**(9):919-926.
28. Conklin HM, Krull KR, Reddick WE, Pei D, Cheng C, Pui CH: **Cognitive outcomes following contemporary treatment without cranial irradiation for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *J Natl Cancer Inst* 2012, **104**(18):1386-1395.
29. Jacola LM, Krull KR, Pui CH, Pei D, Cheng C, Reddick WE, Conklin HM: **Longitudinal Assessment of Neurocognitive Outcomes in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on a Contemporary Chemotherapy Protocol.** *J Clin Oncol* 2016, **34**(11):1239-1247.
30. Halsey C, Buck G, Richards S, Vargha-Khadem F, Hill F, Gibson B: **The impact of therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia on intelligence quotients; results of the**

- risk-stratified randomized central nervous system treatment trial MRC UKALL XI.** *J Hematol Oncol* 2011, **4**:42.
31. Krull KR, Brinkman TM, Li C, Armstrong GT, Ness KK, Srivastava DK, Gurney JG, Kimberg C, Krasin MJ, Pui CH, Robison LL, Hudson MM: **Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study.** *J Clin Oncol* 2013, **31**(35):4407-4415.
  32. Vagace JM, de la Maya MD, Caceres-Marzal C, Gonzalez de Murillo S, Gervasini G: **Central nervous system chemotoxicity during treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia/lymphoma.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2012, **84**(2):274-286.
  33. Williams MT, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, Tavor S, Sinclair P, Dormon K, Masic D, Perry T, Weston VJ, Kearns P, Blair H, Russell LJ, Heidenreich O, Irving JA, Izraeli S, Vormoor J, Graham GJ, Halsey C: **The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts.** *Blood* 2016, **127**(16):1998-2006.
  34. Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardo C, Vivanco JL, Molina J, Fuster JL, Couselo JM, de Toledo JS, Bureo E, Madero L, Ramirez M: **Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse.** *Am J Hematol* 2013, **88**(5):359-364.
  35. Pine SR, Yin C, Matloub YH, Sabaawy HE, Sandoval C, Levendoglu-Tugal O, Ozkaynak MF, Jayabose S: **Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction.** *J Mol Diagn* 2005, **7**(1):127-132.
  36. Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Tone LG: **Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid cells in suspected leptomeningeal involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison to cytomorphological analysis.** *Diagn Mol Pathol* 2003, **12**(3):124-127.
  37. Bromberg JE, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Smitt PS, van den Bent MJ, van't Veer M, Gratama JW: **CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies.** *Neurology* 2007, **68**(20):1674-1679.
  38. Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Moricke A, Zimmermann M, Schrauder A, Karawajew L, Ludwig WD, Welte K, Schunemann HJ, Schlegelberger B, Schrappe M, Stanulla M: **High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(30):4813-4820.
  39. van der Velden VH, de Launay D, de Vries JF, de Haas V, Sonneveld E, Voerman JS, de Bie M, Revesz T, Avigad S, Yeoh AE, Swagemakers SM, Eckert C, Pieters R, van Dongen JJ: **New cellular markers at diagnosis are associated with isolated central nervous system relapse in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.** *Br J Haematol* 2016, **172**(5):769-781.
  40. Krause S, Pfeiffer C, Strube S, Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Loges S, Waizenegger J, Ben-Batalla I, Cario G, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M, Schewe DM: **Mer tyrosine kinase promotes the survival of t(1;19)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the central nervous system (CNS).** *Blood* 2015, **125**(5):820-830.
  41. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J: **Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels.** *Nature* 2015, **523**(7560):337-341.
  42. Frishman-Levy L, Izraeli S: **Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy.** *Br J Haematol* 2017, **176**(2):157-167.
  43. Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Belau NM, Zimmermann M, Wirbelauer T, Spielberg S, Vossen-Gajcy M, Cario G, Schrappe M, Schewe DM: **The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system.** *Haematologica* 2017, **102**(2):346-355.
  44. Frishman-Levy L, Shemesh A, Bar-Sinai A, Ma C, Ni Z, Frenkel S, Muench V, Bruckmueller H, Vokuhl C, Debatin KM, Eckert C, Stanulla M, Schrappe M, Campbell KS, Loewenthal R, Schewe DM, Hochman J, Meyer LH, Kaufman D, Cario G, Porgador A, Izraeli S: **Central**

- nervous system acute lymphoblastic leukemia: role of natural killer cells.** *Blood* 2015, **125**(22):3420-3431.
45. Williams MT, Yousafzai Y, Cox C, Blair A, Carmody R, Sai S, Chapman KE, McAndrew R, Thomas A, Spence A, Gibson B, Graham GJ, Halsey C: **Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2014, **123**(20):3116-3127.
  46. Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, Klinakis A, Lukyanov Y, Tseng JC, Sen F, Gehrie E, Li M, Newcomb E, Zavadi J, Meruelo D, Lipp M, Ibrahim S, Efstratiadis A, Zagzag D, Bromberg JS, Dustin ML, Aifantis I: **CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia.** *Nature* 2009, **459**(7249):1000-1004.
  47. Chen HL, Liao F, Lin TN, Liu FT: **Galectins and neuroinflammation.** *Adv Neurobiol* 2014, **9**:517-542.
  48. Pena C, Mirandola L, Figueroa JA, Hosiriluck N, Suvorava N, Trotter K, Reidy A, Rakhshanda R, Payne D, Jenkins M, Grizzi F, Littlefield L, Chiriva-Internati M, Cobos E: **Galectins as therapeutic targets for hematological malignancies: a hopeful sweetness.** *Ann Transl Med* 2014, **2**(9):87.
  49. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al.: **Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.** *Cell* 1994, **76**(4):597-598.
  50. Liu FT, Rabinovich GA: **Galectins as modulators of tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(1):29-41.
  51. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT: **Galectins: structure, function and therapeutic potential.** *Expert Rev Mol Med* 2008, **10**:e17.
  52. Vladoiu MC, Labrie M, St-Pierre Y: **Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review).** *Int J Oncol* 2014, **44**(4):1001-1014.
  53. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW: **Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1855**(2):235-247.
  54. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
  55. Ho MK, Springer TA: **Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.** *J Immunol* 1982, **128**(3):1221-1228.
  56. Dumic J, Dabelic S, Flogel M: **Galectin-3: an open-ended story.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1760**(4):616-635.
  57. Newlaczyl AU, Yu LG: **Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer.** *Cancer Lett* 2011, **313**(2):123-128.
  58. Pasquini LA, Millet V, Hoyos HC, Giannoni JP, Croci DO, Marder M, Liu FT, Rabinovich GA, Pasquini JM: **Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function.** *Cell Death Differ* 2011, **18**(11):1746-1756.
  59. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, Stelling MP, Pavao MS: **Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis.** *Front Oncol* 2014, **4**:138.
  60. Konstantinov KN, Robbins BA, Liu FT: **Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, is a marker of anaplastic large-cell lymphoma.** *Am J Pathol* 1996, **148**(1):25-30.
  61. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M: **Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(42):17468-17473.
  62. Asgarian-Omran H, Forghani P, Hojjat-Farsangi M, Roohi A, Sharifian RA, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Shokri F: **Expression profile of galectin-1 and galectin-3 molecules in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia.** *Cancer Invest* 2010, **28**(7):717-725.
  63. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A: **Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system.** *Cancer* 1997, **80**(4):776-787.



64. Strik HM, Deininger MH, Frank B, Schluesener HJ, Meyermann R: **Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas.** *J Neurooncol* 2001, **53**(1):13-20.
65. Neder L, Marie SK, Carlotti CG, Jr., Gabbai AA, Rosemberg S, Malheiros SM, Siqueira RP, Oba-Shinjo SM, Uno M, Aguiar PH, Miura F, Chammas R, Colli BO, Silva WA, Jr., Zago MA: **Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas.** *Brain Pathol* 2004, **14**(4):399-405.
66. Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Muraige CA, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Ruchoux MM, Brothi J, Zick Y, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R: **Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration.** *Brain Pathol* 2001, **11**(1):12-26.
67. Cheng CL, Hou HA, Lee MC, Liu CY, Jhuang JY, Lai YJ, Lin CW, Chen HY, Liu FT, Chou WC, Chen CY, Tang JL, Yao M, Huang SY, Ko BS, Wu SJ, Tsay W, Tien HF: **Higher bone marrow LGALS3 expression is an independent unfavorable prognostic factor for overall survival in patients with acute myeloid leukemia.** *Blood* 2013, **121**(16):3172-3180.
68. Fei F, Abdel-Azim H, Lim M, Arutyunyan A, von Itzstein M, Groffen J, Heisterkamp N: **Galectin-3 in pre-B acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2013, **27**(12):2385-2388.
69. Ruvolo PP: **Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment.** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1863**(3):427-437.
70. Giordano M, Croci DO, Rabinovich GA: **Galectins in hematological malignancies.** *Curr Opin Hematol* 2013, **20**(4):327-335.
71. Montesinos-Rongen M, Purschke FG, Brunn A, May C, Nordhoff E, Marcus K, Deckert M: **Primary Central Nervous System (CNS) Lymphoma B Cell Receptors Recognize CNS Proteins.** *J Immunol* 2015, **195**(3):1312-1319.
72. Cummings CT, Deryckere D, Earp HS, Graham DK: **Molecular pathways: MERTK signaling in cancer.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(19):5275-5280.
73. Graham DK, Salzberg DB, Kurtzberg J, Sather S, Matsushima GK, Keating AK, Liang X, Lovell MA, Williams SA, Dawson TL, Schell MJ, Anwar AA, Snodgrass HR, Earp HS: **Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(9):2662-2669.
74. Brandao LN, Wings A, Christoph S, Sather S, Migdall-Wilson J, Schlegel J, McGranahan A, Gao D, Liang X, Deryckere D, Graham DK: **Inhibition of MerTK increases chemosensitivity and decreases oncogenic potential in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Blood Cancer J* 2013, **3**:e101.
75. Linger RM, Lee-Sherick AB, DeRyckere D, Cohen RA, Jacobsen KM, McGranahan A, Brandao LN, Wings A, Sawczyn KK, Liang X, Keating AK, Tan AC, Earp HS, Graham DK: **Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2013, **122**(9):1599-1609.
76. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ: **Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(5):551-565.
77. Alsadeq A, Schewe DM: **Acute lymphoblastic leukemia of the central nervous system: on the role of PBX1.** *Haematologica* 2017, **102**(4):611-613.
78. Christoph S, Deryckere D, Schlegel J, Frazer JK, Batchelor LA, Trakhimets AY, Sather S, Hunter DM, Cummings CT, Liu J, Yang C, Kireev D, Simpson C, Norris-Drouin J, Hull-Ryde EA, Janzen WP, Johnson GL, Wang X, Frye SV, Earp HS, 3rd, Graham DK: **UNC569, a novel small-molecule mer inhibitor with efficacy against acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**(11):2367-2377.
79. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R: **Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.** *Blood* 1979, **54**(3):713-733.

80. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM: **HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3.** *Blood* 1988, **71**(1):242-247.
81. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** *Int J Cancer* 1977, **19**(5):621-626.
82. Tomeczkowski J, Yakisan E, Wieland B, Reiter A, Welte K, Sykora KW: **Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells.** *Br J Haematol* 1995, **89**(4):771-779.
83. Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E, Campana D: **Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase.** *Br J Haematol* 2003, **120**(5):846-849.
84. Nister M, Heldin CH, Westermarck B: **Clonal variation in the production of a platelet-derived growth factor-like protein and expression of corresponding receptors in a human malignant glioma.** *Cancer Res* 1986, **46**(1):332-340.
85. Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, Bohlander SK, Suto Y, Giordano L, Gupta R, Fears S, Nucifora G, Rowley JD: **TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines.** *Blood* 1996, **88**(3):785-794.
86. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ: **A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse.** *Nature* 1983, **301**(5900):527-530.
87. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al.: **Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.** *J Immunol* 1995, **154**(1):180-191.
88. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T: **NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells.** *Blood* 2002, **100**(9):3175-3182.
89. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T: **The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID.** *Annu Rev Immunol* 1996, **14**:179-205.
90. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K: **Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**(2):377-381.
91. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schafer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR, International BFMSG: **Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2008, **22**(4):771-782.
92. Conter V, Arico M, Basso G, Biondi A, Barisone E, Messina C, Parasole R, De Rossi G, Locatelli F, Pession A, Santoro N, Micalizzi C, Citterio M, Rizzari C, Silvestri D, Rondelli R, Lo Nigro L, Ziino O, Testi AM, Masera G, Valsecchi MG, Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia P: **Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2010, **24**(2):255-264.
93. Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, Raz A: **Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target.** *J Bioenerg Biomembr* 2007, **39**(1):79-84.
94. La Jolla Pharmaceutical Company: **IND 124851, SN0000.** 2014.
95. Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, Schey SA, Gribben JG, Cotter FE: **GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death.** *Blood* 2010, **115**(19):3939-3948.
96. Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Neri P, He D, Mitsiades N, Richardson P, Chang Y, Schindler J, Carver B, Anderson KC: **A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100**

- overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells.** *Cancer Res* 2005, **65**(18):8350-8358.
97. Demotte N, Wieers G, Van Der Smissen P, Moser M, Schmidt C, Thielemans K, Squifflet JL, Weynand B, Carrasco J, Lurquin C, Courttoy PJ, van der Bruggen P: **A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice.** *Cancer Res* 2010, **70**(19):7476-7488.
  98. Ruvolo PP, Ruvolo VR, Benton CB, AlRawi A, Burks JK, Schober W, Rolke J, Tidmarsh G, Hail N, Jr., Davis RE, Andreeff M: **Combination of galectin inhibitor GCS-100 and BH3 mimetics eliminates both p53 wild type and p53 null AML cells.** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1863**(4):562-571.
  99. Clark MC, Pang M, Hsu DK, Liu FT, de Vos S, Gascoyne RD, Said J, Baum LG: **Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death.** *Blood* 2012, **120**(23):4635-4644.
  100. Barker PE, Carroll AJ, Cooper MD: **t(1;19)(q23;p13) in pre-B acute lymphocytic leukemia cell line 697.** *Cancer Genet Cytogenet* 1987, **25**(2):379-380.
  101. Uphoff CC, MacLeod RA, Denkmann SA, Golub TR, Borkhardt A, Janssen JW, Drexler HG: **Occurrence of TEL-AML1 fusion resulting from (12;21) translocation in human early B-lineage leukemia cell lines.** *Leukemia* 1997, **11**(3):441-447.
  102. Naumovski L, Morgan R, Hecht F, Link MP, Glader BE, Smith SD: **Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines without classical breakpoint cluster region rearrangement.** *Cancer Res* 1988, **48**(10):2876-2879.
  103. Stong RC, Korsmeyer SJ, Parkin JL, Arthur DC, Kersey JH: **Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics.** *Blood* 1985, **65**(1):21-31.
  104. Scheid MP, Woodgett JR: **PKB/AKT: functional insights from genetic models.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(10):760-768.
  105. Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, Andre S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM, Rosewicz S: **Galectin-1 interacts with the  $\alpha_5\beta_1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27.** *J Biol Chem* 2005, **280**(44):37266-37277.
  106. Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J, Liu FT: **Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily.** *J Biol Chem* 2001, **276**(23):20252-20260.
  107. Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, Schiffer I, Paz H, Fabbri M, Abdel-Azim H, Groffen J, Heisterkamp N: **B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3.** *Oncotarget* 2015, **6**(13):11378-11394.
  108. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, Maverakis E, Yang RY, Hsu DK, Dustin ML, Liu FT: **Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the immunological synapse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(34):14496-14501.
  109. Choudhuri K, Llodra J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpfennig KW, Kam LC, Stokes DL, Dustin ML: **Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse.** *Nature* 2014, **507**(7490):118-123.
  110. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y: **Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation.** *Scand J Immunol* 2010, **71**(4):267-274.
  111. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y: **Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins.** *Int J Oncol* 2011, **38**(2):385-390.
  112. Sioud M: **New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins.** *Scand J Immunol* 2011, **73**(2):79-84.
  113. Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A: **Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells.** *Cancer Res* 1999, **59**(16):4148-4154.
  114. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A: **Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin.** *Cancer Res* 2004, **64**(18):6363-6367.

115. Hu K, Gu Y, Lou L, Liu L, Hu Y, Wang B, Luo Y, Shi J, Yu X, Huang H: **Galectin-3 mediates bone marrow microenvironment-induced drug resistance in acute leukemia cells via Wnt/beta-catenin signaling pathway.** *J Hematol Oncol* 2015, **8**:1.
116. Cecchinelli B, Lavra L, Rinaldo C, Iacovelli S, Gurtner A, Gasbarri A, Ulivieri A, Del Prete F, Trovato M, Piaggio G, Bartolazzi A, Soddu S, Sciacchitano S: **Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(12):4746-4757.
117. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A: **Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family.** *Cancer Res* 1997, **57**(23):5272-5276.
118. Yu F, Finley RL, Jr., Raz A, Kim HR: **Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(18):15819-15827.
119. Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W: **Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis.** *FEBS Lett* 2000, **473**(3):311-315.
120. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W: **Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal.** *J Cell Physiol* 2012, **227**(2):401-407.
121. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA: **Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy.** *Cancer Res* 2009, **69**(4):1545-1552.
122. Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA: **TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling.** *Nat Cell Biol* 2013, **15**(11):1351-1361.
123. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z: **Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins.** *PLoS One* 2011, **6**(8):e20599.
124. Nau R, Sorgel F, Eiffert H: **Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections.** *Clin Microbiol Rev* 2010, **23**(4):858-883.
125. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K: **Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1572**(2-3):232-254.
126. Sakaki M, Oka N, Nakanishi R, Yamaguchi K, Fukumori T, Kanayama HO: **Serum level of galectin-3 in human bladder cancer.** *J Med Invest* 2008, **55**(1-2):127-132.
127. Vereecken P, Awada A, Suci S, Castro G, Morandini R, Litynska A, Lienard D, Ezzedine K, Ghanem G, Heenen M: **Evaluation of the prognostic significance of serum galectin-3 in American Joint Committee on Cancer stage III and stage IV melanoma patients.** *Melanoma Res* 2009, **19**(5):316-320.
128. Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, Peng J: **Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach.** *J Proteome Res* 2010, **9**(10):5133-5141.
129. Savman K, Heyes MP, Svedin P, Karlsson A: **Microglia/macrophage-derived inflammatory mediators galectin-3 and quinolinic acid are elevated in cerebrospinal fluid from newborn infants after birth asphyxia.** *Transl Stroke Res* 2013, **4**(2):228-235.
130. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E: **Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression.** *Gastroenterology* 1997, **113**(6):1906-1915.
131. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R: **Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation.** *J Neuroinflammation* 2010, **7**:30.
132. Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF: **Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy.** *Leuk Res* 2011, **35**(6):705-711.

133. Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Yong VW, Nuttall RK, Pennington CJ, Edwards DR, Bar-Or A: **Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells.** *J Immunol* 2003, **170**(9):4497-4505.
134. Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, Gibson LF: **VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers.** *Exp Hematol* 2010, **38**(9):733-743.
135. Monnot AD, Zheng W: **Culture of choroid plexus epithelial cells and in vitro model of blood-CSF barrier.** *Methods Mol Biol* 2013, **945**:13-29.
136. Lazarevic I, Engelhardt B: **Modeling immune functions of the mouse blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro: primary rather than immortalized mouse choroid plexus epithelial cells are suited to study immune cell migration across this brain barrier.** *Fluids Barriers CNS* 2016, **13**:2.
137. Townsend EC, Murakami MA, Christodoulou A, Christie AL, Koster J, DeSouza TA, Morgan EA, Kallgren SP, Liu H, Wu SC, Plana O, Montero J, Stevenson KE, Rao P, Vadhi R, Andreeff M, Armand P, Ballen KK, Barzaghi-Rinaudo P, Cahill S, Clark RA, Cooke VG, Davids MS, DeAngelo DJ, Dorfman DM, Eaton H, Ebert BL, Etchin J, Firestone B, Fisher DC, Freedman AS, Galinsky IA, Gao H, Garcia JS, Garnache-Ottou F, Graubert TA, Gutierrez A, Halilovic E, Harris MH, Herbert ZT, Horwitz SM, Inghirami G, Intlekofer AM, Ito M, Izraeli S, Jacobsen ED, Jacobson CA, Jeay S, Jeremias I, Kelliher MA, Koch R, Konopleva M, Kopp N, Kornblau SM, Kung AL, Kupper TS, LeBoeuf NR, LaCasce AS, Lees E, Li LS, Look AT, Murakami M, Muschen M, Neuberg D, Ng SY, Odejide OO, Orkin SH, Paquette RR, Place AE, Roderick JE, Ryan JA, Sallan SE, Shoji B, Silverman LB, Soiffer RJ, Steensma DP, Stegmaier K, Stone RM, Tamburini J, Thorner AR, van Hummelen P, Wadleigh M, Wiesmann M, Weng AP, Wuerthner JU, Williams DA, Wollison BM, Lane AA, Letai A, Bertagnolli MM, Ritz J, Brown M, Long H, Aster JC, Shipp MA, Griffin JD, Weinstock DM: **The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice.** *Cancer Cell* 2016, **30**(1):183.
138. Schewe DM, Alsadeq A, Sattler C, Lenk L, Vogiatzi F, Cario G, Vieth S, Valerius T, Roskopf S, Meyersieck F, Alten J, Schrappe M, Gramatzki M, Peipp M, Kellner C: **An Fc engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts.** *Blood* 2017.
139. Zubietta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J: **Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies.** *Am J Pathol* 2006, **168**(5):1666-1675.
140. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF: **Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells.** *Cancer Res* 2008, **68**(17):7228-7236.
141. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW: **Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation.** *Nature* 2001, **409**(6821):733-739.
142. Chen HL, Li CF, Grigorian A, Tian W, Demetriou M: **T cell receptor signaling co-regulates multiple Golgi genes to enhance N-glycan branching.** *J Biol Chem* 2009, **284**(47):32454-32461.
143. Demotte N, Bigirimana R, Wieers G, Stroobant V, Squifflet JL, Carrasco J, Thielemans K, Baurain JF, Van Der Smissen P, Courtoy PJ, van der Bruggen P: **A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**(7):1823-1833.
144. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, Tian Z: **Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human Nkp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack.** *J Biol Chem* 2014, **289**(48):33311-33319.
145. Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, De Propriis MS, Vitale A, Bertaina A, Barberi W, Moretta L, Basso G, Santoni A, Guarini A, Locatelli F, Foa R: **Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells.** *Haematologica* 2014, **99**(7):1248-1254.
146. Cook RS, Jacobsen KM, Wofford AM, DeRyckere D, Stanford J, Prieto AL, Redente E, Sandahl M, Hunter DM, Strunk KE, Graham DK, Earp HS, 3rd: **MerTK inhibition in tumor leukocytes decreases tumor growth and metastasis.** *J Clin Invest* 2013, **123**(8):3231-3242.

- 147. Paolino M, Choidas A, Wallner S, Pranjić B, Uribealago I, Loeser S, Jamieson AM, Langdon WY, Ikeda F, Fededa JP, Cronin SJ, Nitsch R, Schultz-Fademrecht C, Eickhoff J, Menninger S, Unger A, Torka R, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Wolf D, Ullrich A, Klebl BM, Penninger JM: **The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells.** *Nature* 2014, **507**(7493):508-512.
- 148. Bonzi J, Bornet O, Betzi S, Kasper BT, Mahal LK, Mancini SJ, Schiff C, Sebban-Kreuzer C, Guerlesquin F, Elantak L: **Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions.** *Nat Commun* 2015, **6**:6194.

## 7 Anhang

**Tab. 17: Die Gal-1 Expressionslevel bei Erstdiagnose korrelieren nicht mit klinischen Parametern bei 61 an t(1;19)<sup>+</sup> ALL erkrankten Kindern und Jugendlichen**

	Gal-1 niedrig (n=30)	Gal-1 hoch (n=31)	p
<b>Geschlecht<sup>*</sup></b>			0,4443
männlich	15	12	
weiblich	15	19	
<b>Alter bei Erstdiagnose<sup>**</sup></b>			0,8930
< 10 Jahre	16	16	
≥ 10 Jahre	14	15	
<b>Anzahl initialer Leukozyten<sup>1 **</sup></b>			0,7812
< 10 000	8	7	
10 000 - 50 000	16	15	
50 000 - 100 000	3	6	
≥ 100 000	3	3	
<b>Prednisone response<sup>2 *</sup></b>			1
PRED-GR	25	26	
PRED-PR	5	5	
<b>Risikogruppe nach MRD<sup>3 **</sup></b>			0,3542
Standardrisiko	15	10	
Mittleres Risiko	10	15	
Hochrisiko	5	6	
<b>Mittelwert (Wertebereich) der Leukozyten im Liquor an Tag 0<sup>4 ***</sup></b>	3.4 (0-42)	8 (0-142)	0,3805
<b>Blasten im Liquor-Zytospin<sup>*</sup></b>			0,4345
nein	17	21	
ja	13	10	
<b>ZNS-Status<sup>5 **</sup></b>			0,5634
ZNS1	16	20	
ZNS2	10	9	
ZNS3 (ZNS3c)	4 (1)	2 (2)	
<b>Rezidiv und Tod<sup>*</sup></b>			1
nein	29	29	
ja	1	1	

**Erläuterungen:** \*Exakter Fisher Test, einseitig; \*\*Chi-Quadrat-Test; \*\*\*Mann-Whitney-Test, zweiseitig;

<sup>1</sup>n = 7 keine Angabe; <sup>2</sup> Prednisone Good Response (PRED-GR): < 1000 Blast/μL bei der zytologischen Bewertung des Blastenanteils im Blutaussstrich nach der ersten Therapiewoche (nur Prednison 60 mg/m<sup>2</sup>/d und eine Gabe intrathekales Methotrexat); Prednisone Poor Response (PRED-PR): > 1000 Blast/μL;

<sup>3</sup> Standardrisiko = keine MRD-Last an Tag 33 (Zeitpunkt R1) und Tag 78 (R2); Mittleres Risiko = MRD-Last < 10<sup>3</sup> an R1 und/oder R2; Hochrisiko = R2 ≥ 10<sup>3</sup>;

<sup>4</sup>n = 1 keine Angabe;

<sup>5</sup> ZNS1 = keine klinischen oder radiologische Zeichen eines ZNS-Befalls und keine leukämischen Blasten im Liquor-Zytospin; ZNS2 = keine klinischen oder radiologische Zeichen eines ZNS-Befalls; ZNS2a = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl ≤ 5/μl und Erythrozytenzahl ≤ 10/μl ohne makroskopisch sichtbares Blut; ZNS2b = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl ≤ 5/μl und Erythrozytenzahl ≥ 10/μl und/oder makroskopisch sichtbares Blut; ZNS2c = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl > 5/μl und Erythrozytenzahl ≥ 10/μl und/oder makroskopisch sichtbares Blut, aber erfüllt, wenn (Leukozytenzahl<sup>L</sup>/Erythrozytenzahl<sup>L</sup>)/ (Leukozytenzahl<sup>B</sup>/Erythrozytenzahl<sup>B</sup>) > 2; ZNS3 – ZNS3a = Blasten im Liquor mit einer Leukozytenzahl > 5/μl und Erythrozytenzahl < 10/μl ohne makroskopisch sichtbares Blut; ZNS3c = klinisch oder radiologisch detektierbarer ZNS-Befall oder retinale Beteiligung

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Martin Schrappe für die Möglichkeit, in seiner Klinik experimentell forschen zu können.

Ganz besonders großer Dank gebührt PD Dr. Denis Schewe für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, für Begeisterung, Förderung und Forderung, Vertrauen und stete Diskussionsbereitschaft.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Dr. Ameera Alsadeq und meiner (erweiterten) Laborgruppe, Steffi Spielberg und Christian Pfeiffer für wissenschaftlichen Austausch und gegenseitige Unterstützung, Juliane Schmäh, Dr. Sarah Habig, Katrin Timm-Richert und Katrin Neumann für die liebe Hilfe bei Fragen und die Einführung in die Laborarbeit, sowie Sarah Neugeschwender und Tim Wirbelauer. Außerdem den Mitarbeiterinnen des MRD-Labors für das gute Arbeitsklima in gemeinsamen Räumlichkeiten und der ALL-BFM-Studiengruppe für die Bereitstellung klinischer Patientendaten. Auch für die gute Zusammenarbeit mit der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel, mit Prof. Dr. Gerhard Schultheiß und Erika Raabe, möchte ich mich bedanken. Dr. Christian Vokuhl danke ich für die Auswertung der histologischen Schnitte.

Danken möchte ich außerdem Katharina Dohmen, Lilli Otto, Dr. Nadine John und in ganz besonderer Weise Dr. Lennart Lenk für das Lesen und/oder Diskutieren (von Teilen) dieser Arbeit. Johann Böhmer danke ich für die geduldige Umsetzung meiner Vorstellungen der schematischen Abbildungen (Abb. 1, 2, 12B und 17).

Ein herzlicher Dank gilt weiterhin der Begabtenförderung der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit für die individuelle Förderung während meines Studiums.

Meine innigste Dankbarkeit gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Cousine und ihrem Mann für bedingungslose Unterstützung und Rückhalt in allen Lagen meines Lebens.